



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IRLA CARLA DE FRANÇA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE UM FITOTERÁPICO TÓPICO À BASE
DE AROEIRA: adequações à legislação no decorrer de 20 anos**

Recife
2020

IRLA CARLA DE FRANÇA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE UM FITOTERÁPICO TÓPICO À BASE
DE AROEIRA: adequações à legislação no decorrer de 20 anos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Leila Bastos Leal

Co-orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Recife
2020

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

B238a Barbosa, Irla Carla de França

Avaliação da qualidade de um fitoterápico tópico à base de aroeira: adequações à legislação no decorrer de 20 anos / Irla Carla de França Barbosa. – 2020.

70 f.: il.; tab.

Orientadora: Leila Bastos Leal.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.

Inclui referências e apêndice.

1. Aroeira. 2. Medicamentos Fitoterápicos. 3. Técnicas In Vitro. 4. Membranas Mucosas. 5. Cremes, Espumas e Géis Vaginais. I. Leal, Leila Bastos (Orientadora). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2020 -115)

IRLA CARLA DE FRANÇA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE UM FITOTERÁPICO TÓPICO À BASE DE
AROEIRA: ADEQUAÇÕES À LEGISLAÇÃO NO DECORRER DE 20 ANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 18/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. ^a Dr. ^a Leila Bastos Leal (Orientadora - Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. ^a Dr. ^a Karina Perrelli Randau (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. ^a Dr. ^a Danilo César Galindo Bedor (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais, Ivone e Carlos, verdadeiros protótipos de anjos na Terra. Com todo meu amor e gratidão, desejo ser sempre motivo de orgulho, a prova de que tudo que vocês fizeram e fazem por mim tem valido à pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, de onde tirei todas as forças necessárias nos momentos de dificuldade, meu conforto em todos os momentos

Aos meus pais, Ivone e Carlos, por todo incentivo, amor e apoio em todos os momentos.

À minha irmã Ially, pela amizade, alegria e companheirismo; e meu sobrinho Gabriel, por ser a dose de amor e alegria na vida tão corrida.

À Prof^a. Dr^a. Leila Bastos Leal, minha orientadora, pela oportunidade, paciência orientação e ensinamentos, tanto na academia, quanto na vida como um todo, você é inspiração.

Ao Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, meu coorientador, pelo apoio e oportunidade.

Aos colegas de laboratório por todos os momentos agradáveis durante esse período. Em especial a Wellithom, Juliana e Maira por terem me ajudado em etapas fundamentais deste trabalho, mesmo com suas vidas atribuladas. Saibam que sou muito grata à ajuda de vocês.

Ao grupo NUDFAC como um todo: Isabelle, Karol Belém, Carol Chagas, Juliana, Maira, Wellithom, Asley, Aurylanne, Camila, Amélia, Júlia, Carol Costa, Ana Rosa e Thalita. Toda e qualquer contribuição, por menor que tenha sido, foi muito importante para que meu trabalho pudesse ser concluído. Meu muito obrigada a todos!

À minha amiga Carol Chagas, por todo o suporte emocional, pelo amor, pelo incentivo, por me ensinar tanto, por acreditar em mim, pelas águas de côco pós almoço diariamente, por estar sempre comigo, você é uma inspiração grandiosa na minha vida!

À Karol Belém e Isabelle, amigas da graduação que o mestrado reaproximou, pela companhia, grandiosas contribuições, conselhos e pelos momentos agradáveis.

À Alisson, por todas as palavras de incentivo, paciência, companheirismo e apoio nas crises, e por ser meu aliado até nas análises estatísticas.

À todos os meus amigos, pela contribuição nessa jornada, pelos momentos de alívio do stress e preocupação, e pelas palavras de apoio.

Aos professores e funcionários do PPGCF-UFPE, em especial Rilvan e Nerilin, que desempenham seu trabalho de tal forma a nos acolher, e nos deixar seguros dentro das possibilidades.

À CAPES/HEBRON pela bolsa e amostras concedidas para realização deste trabalho.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes” (NEWTON, 1675).

RESUMO

O uso de plantas medicinais pela população para fins terapêuticos é uma prática antiga, possuindo registro de uso antes de Cristo. No entanto, apesar de ser uma prática difundida, sua regulamentação no Brasil iniciou de forma tardia, passando por inúmeras mudanças no correr do tempo. Atualmente o registro de fitoterápicos é regido pela RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 da ANVISA. No caso de medicamentos fitoterápicos tópicos (FT), a não existência de um guia oficial para avaliação de performance dos mesmos, faz necessária a busca de informações em compêndios como a Farmacopéia America e Européia. Considerando a importância da avaliação dos atributos de qualidade e performance dos FT, este trabalho buscou avaliar a qualidade de um gel de uso ginecológico à base de aroeira, previamente registrado no ano de 2001, e comercializado até os dias atuais. Utilizando como base os guias e legislações atualizados, o produto foi avaliado através da verificação do pH, espalhabilidade da formulação, comportamento reológico, estudo de liberação *in vitro*, estudo de permeação e retenção *ex vivo* utilizando mucosa vaginal suína em células de difusão de Franz, avaliação da segurança através da Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP), e avaliação histológica da mucosa vaginal suína antes e após aplicação do produto. A análise foi realizada através da quantificação do ácido gálico (marcador químico da planta) no líquido receptor e mucosa, através de metodologia validada por Cromatografia líquida de alta performance com detector UV. O método validado mostrou-se eficiente para a quantificação do ácido gálico sem a presença de interferentes da mucosa vaginal suína. Após o estudo de permeação, não foi quantificado ácido gálico no líquido receptor, ou seja, o ativo avaliado não atravessa a mucosa, o que determina o produto como seguro, principalmente por se tratar de uma formulação de ação local. Além disso, o pH da formulação encontra-se dentro da faixa considerada normal para uso em mulheres sadias. A avaliação da segurança através do BCOP classificou o gel como irritante severo à córnea bovina, sendo este resultado justificado pela presença de tanino na formulação. Somado a isto, a coloração intensa do produto pode levar a resultados mal interpretados. Por fim, a avaliação histológica da mucosa mostrou alterações compatíveis com a aplicação de taninos (compostos majoritários da planta), e sem alterações indicativas de perda da integridade do tecido.

Palavras-chave: Aroeira. Medicamentos Fitoterápicos. Técnicas In Vitro. Membranas Mucosas. Cremes, Espumas e Géis Vaginais.

ABSTRACT

The use of medicinal plants by the population for therapeutic purposes is an old practice, having a record of use before Christ. However, despite being a widespread practice, its regulation in Brazil started late, going through numerous changes over time. Currently the phytotherapeutic registration is governed by RDC nº 26, of May 13, 2014 from ANVISA. In the case of topical herbal medicines (FT), the lack of an official guide to assess their performance, makes it necessary to search for information in compendiums such as American and European Pharmacopoeia. Considering the importance of evaluating the quality and performance attributes of FT, this work sought to evaluate the quality of a gynecological gel based on aroeira, previously registered in 2001, and commercialized until the current days. Based on updated guides and legislation, the product was evaluated by assessing the pH, spreadability of the formulation, rheological properties, in vitro release study, permeation and ex vivo retention study using porcine vaginal mucosa in Franz diffusion cells, safety assessment through opacity and permeability of the bovine cornea (BCOP), and histological evaluation of the porcine vaginal mucosa before and after application of the product. The analysis was performed through the quantification of gallic acid (chemical marker of the plant) in the receptor solution, through a methodology validated by high performance liquid chromatography with UV detector. The validated method proved to be efficient for the quantification of gallic acid without the presence of porcine vaginal mucosa interferents. After the permeation study, gallic acid was not quantified in the receptor solution, that is, it does not cross the mucosa, which determines the product as safe, since it is a local action formulation. In addition, the pH of the formulation is within the range considered normal for use in healthy women. The BCOP safety assessment classified the gel as a severe irritant to the bovine cornea, being justified by the presence of tannin in the formulation. Evaluation errors may also have occurred, since it is an intensely colored product. Finally, the histological evaluation of the mucosa showed changes compatible with the application of tannins, major compounds of the plant. However, no changes were observed indicating loss of tissue integrity.

Keywords: Anacardiaceae. Phytotherapeutic Drugs. In Vitro Techniques. Mucous Membrane. Vaginal Creams, Foams and Jelly.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Árvore de <i>S. terebinthifolius</i> Radii jovem	27
Figura 2 –	Flores e folhas de <i>S. terebinthifolius</i> Raddi	28
Figura 3 –	Frutos de <i>S. terebinthifolius</i> Raddi	28
Figura 4 –	Estruturas químicas de taninos hidrolizáveis	30
Figura 5 –	Estruturas químicas dos taninos condensados	30
Figura 6 –	Gel vaginal à base de <i>S. terebinthifolius</i> Raddi (Kronel®).....	33
Figura 7 –	Histologia do epitélio vaginal humano	35
Figura 8 –	Espalhabilidade das formulações estudadas	48
Figura 9 –	Reograma das formulações (lotes distintos de Kronel® gel e placebo)	49
Figura 10 –	Perfil de liberação das formulações de Kronel® gel vaginal	51
Figura 11 –	Cromatograma do ácido gálico em solução metanólica (LIQ)	53
Figura 12 –	Cromatograma amostra branco da mucosa vaginal extraída.....	53
Figura 13 –	Gráfico de linearidade a partir da curva de calibração média.....	54
Figura 14 –	Cortes histológicos em aumento de 100x: (A) mucosa vaginal suína fresca (B) mucosa vaginal suína após aplicação do placebo (C) mucosa vaginal suína após aplicação do Kronel gel.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio BCOP	46
Tabela 2 –	Valores médios pH das formulações estudadas	47
Tabela 3 –	Valores médios de viscosidade aparente das formulações estudadas (Pascal)	48
Tabela 4 –	Valores médios de teor de ácido gálico nas formulações	50
Tabela 5 –	Resultado estatístico comparativo entre os diferentes lotes de Kronel® gel	52
Tabela 6 –	Valores médios de concentração de cada ponto da curva de calibração, DPR (%) e EPR(%)	54
Tabela 7 –	Precisão (DPR %) e Exatidão (%) do método bioanalítico	55
Tabela 8 –	Resultados do teste BCOP (média $\pm$ D.P)	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido Gálico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCOP	Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta
CQ	Controle de Qualidade
CQA	Controle de Qualidade de Alta Concentração
CQM	Controle de qualidade de média concentração
EC	Etrato córneo
DP	Desvio Padrão Relativo
DO	Densidade Óptica
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Etrato Córneo
ECVAM	Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos
EPR	Erro Padrão Relativo
FDA	Food and Drug Administration
HE	Hematoxilina-Eosina
ICCVAM	Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos Alternativos
IVIS	Índice de irritação <i>in vitro</i>
LD	Limite de Detecção
LIQ	Controle de qualidade de baixa concentração
LQ	Limite de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
LogP	Coeficiente de partição
MF	Medicamento Fitoterápico
MS	Ministério da Saúde
NBF	Formol neutro tamponado
NUDFAC	Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potential hidrogeniônico
PTF	Produto Tradicional Fitoterápico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RPM	Rotações Por Minuto
SNFME	Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
TC	Tecido conjuntivo
TE	Tecido Epitelial
TEWL	Perda de água transepidermal
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
VA	Viscosidade aparente

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca Registrada

mm – Milímetros

°C – Graus Celsius

rpm – Rotações por minuto

mg – Miligramas

mL – Mililitros

v/v – Volume/ volume

μL – Microlitros

μg – Microgramas

cm² - Centímetros quadrados

% – porcentagem

μm – micrômetro

nm - nanômetro

cm – centímetro

g – grama

h – hora

Pa.s – Pascal segundo

p/v- peso/volume

s – segundo

v – volume

r² – Coeficiente de determinação

< - menor que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Objetivo Geral	19
1.1.2	Objetivos Específicos.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	HISTÓRICO DA REGULAMENTAÇÃO DE FITOTERÁPICOS NO BRASIL.....	20
2.2	REQUISITOS DE QUALIDADE E PERFORMANCE DE PRODUTOS TÓPICOS.....	24
2.3	AROEIRA.....	25
2.3.1	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	26
2.3.1.1	Aspectos botânicos.....	27
2.3.1.2	Composição química x propriedades biológicas.....	28
2.3.2	Taninos.....	29
2.4	ÁCIDO GÁLICO.....	31
2.5	GEL VAGINAL À BASE DE <i>S. TEREBINTHIFOLIUS</i> RADDI (KRONEL®).....	32
2.6	MUCOSA VAGINAL.....	33
2.6.1	Mucosa vaginal humana.....	33
2.6.2	Mucosa vaginal suína.....	36
2.7	MODELOS DE ESTUDOS <i>EX VIVO</i>	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	INSUMOS.....	38
3.2	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS FORMULAÇÕES.....	38
3.2.1	Determinação do pH.....	38
3.2.2	Determinação da espalhabilidade.....	38
3.2.3	Determinação das propriedades reológicas.....	38
3.2.4	Determinação do teor de ácido gálico das formulações.....	39
3.3	AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DAS FORMULAÇÕES..	39
3.3.1	Estudo de liberação <i>in vitro</i>.....	39
3.3.1.1	Preparo da membrana sintética hidrofílica.....	39

3.3.1.2	Montagem das células de Franz.....	39
3.3.1.3	Coleta e Quantificação das Amostras.....	39
3.3.1.4	Análise da cinética de liberação in vitro.....	40
3.3.1.5	Análise comparativa lote a lote.....	40
3.3.2	Estudo de permeação ex vivo.....	41
3.3.2.1	Seleção do meio receptor.....	41
3.3.2.2	Seleção do meio extrator.....	41
3.3.2.3	Obtenção da mucosa vaginal.....	41
3.3.2.4	Montagem das células de Franz.....	41
3.3.2.5	Coleta e Quantificação das Amostras.....	41
3.3.2.6	Estudo de retenção do ácido gálico.....	42
3.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE-UV).....	42
3.4.1	Soluções padrão.....	42
3.4.2	Análise cromatográfica.....	43
3.4.3	Validação do método bioanalítico.....	43
3.4.3.1	Seletividade.....	43
3.4.3.2	Efeito residual.....	43
3.4.3.3	Linearidade.....	44
3.4.3.4	Precisão e exatidão.....	44
3.4.3.5	Recuperação.....	44
3.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MUCOSA SUÍNA.....	
3.6	AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA ATRAVÉS DA OPACIDADE E PERMEABILIDADE DA CÓRNEA BOVINA (BCOP).....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DAS FORMULAÇÕES.....	47
4.1.1	Determinação do pH.....	47
4.1.2	Determinação da espalhabilidade.....	47
4.1.3	Propriedades reológicas.....	48

4.1.4	Determinação do teor de ácido gálico das formulações.....	50
4.2	AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DAS FORMULAÇÕES..	50
4.2.1	Estudo de liberação <i>in vitro</i>.....	50
4.2.2	Estudo de permeação <i>ex vivo</i>.....	52
4.2.2.1	Seleção do meio receptor.....	52
4.2.2.2	Seleção do meio extrator.....	52
4.2.2.3	Estudo de retenção do ácido gálico.....	52
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE–UV).....	52
4.3.1	Seletividade.....	52
4.3.2	Efeito residual.....	53
4.3.3	Linearidade.....	53
4.3.4	Precisão e exatidão.....	55
4.3.5	Recuperação.....	55
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MUCOSA SUÍNA.....	55
4.5	AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA ATRAVÉS DA OPACIDADE E PERMEABILIDADE DA CÓRNEA BOVINA (BCOP).....	57
5	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE A – COMPILAÇÃO DA DESCRIÇÃO E ALTERAÇÕES DAS EXIGÊNCIAS NAS LEGISLAÇÕES DE REGISTRO DE FITOTERÁPICOS DESDE A PIONEIRA ATÉ A ATUAL, DE MANEIRA RESUMIDA.....	69

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pela população para fins terapêuticos é uma prática antiga, possuindo registros desde milhares de anos antes de Cristo. No entanto, apenas no século XIX começaram as buscas por constituintes ativos presentes nas plantas medicinais, levando ao conceito da primeira substância ativa com as características conhecidas atualmente. Com o passar do tempo e com base no acúmulo de conhecimento da medicina popular, diferentes formas de utilização de plantas medicinais e fitoterápicos foram desenvolvidas (DUTRA et al., 2016).

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. O interesse por medicamentos fitoterápicos vem aumentando significativamente em todo o mundo, representando cerca de 3% do mercado global de medicamentos, com um movimento de cerca de 30 bilhões de dólares anualmente (MARQUES; SOUZA, 2013; DUTRA, et al., 2016; SILVA, et al., 2017).

No Brasil, a normatização do registro de fitoterápicos iniciou em 1967, com a publicação da Portaria nº 22, a qual exigia apenas informações sobre a planta, entre elas, sua identificação botânica, caracterização da droga vegetal, características organolépticas, físico-químicas e fitoquímicas, além de referências ou trabalho científico para fundamentar o emprego terapêutico, ausência de efeito tóxico e experimentação farmacológica em animais. Apesar de ser um mercado ascendente e possuir papel fundamental para a população, não existia uma regulamentação específica para os fitoterápicos até meados dos anos 90. Isto possibilitou o crescimento desordenado desse mercado, pois até então eram considerados medicamentos de baixo risco, e não haviam estudos concretos acerca do seu uso (OSHIRO et al., 2016).

Apenas 28 anos após a publicação da Portaria nº 22, ocorreu a primeira atualização da legislação para registro de fitoterápicos, que introduziu, para comprovação de eficácia e segurança, a apresentação de estudos de toxicologia e farmacologia pré-clínica e clínica através da Portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995. Desde então, algumas mudanças vêm ocorrendo na legislação, com o objetivo de padronizar o registro dos fitoterápicos, afim de garantir a eficácia e a segurança destes medicamentos (TAPPIN; LUCCHETTI, 2013).

A partir do ano de 1995, o mercado de fitoterápicos foi impactado pela publicação de normas específicas para o registro desta classe de medicamentos. Uma pesquisa realizada em

2015 por Carvalho et al, mostrou que no ano de 2008 existiam 512 medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil, enquanto em 2011 e 2015 foram encontrados apenas 382 e 359 respectivamente. Trata-se, portanto, de uma queda de 31% nos medicamentos fitoterápicos registrados no país, seja por renovação de registro negado devido à falta de cumprimento dos requisitos sanitários, ou pela falta de interesse das indústrias na adequação a nova legislação (PERFEITO, 2012; CARVALHO et al., 2018).

A legislação vigente para o registro de medicamentos fitoterápicos, RDC nº 26 de 13 de maio de 2014, diferencia produto tradicional fitoterápico de medicamento fitoterápico, sendo necessário, para este último, comprovar sua eficácia e segurança por meio de estudos clínicos. (BRASIL, 2014; OSHIRO et al., 2016). Apesar de sucessivas atualizações nas legislações que regulamentam o registro de fitoterápicos, a mudança no cenário regulatório de fitoterápicos é considerado recente.

No caso específico de produto fitoterápico tópico, objeto deste estudo, não existe nenhum guia para avaliação da performance dos mesmos, sendo necessário o uso de monografias da Farmacopeia Americana (USP) e Organização Europeia para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), entre outras. No Brasil, foi publicado recentemente (2019) o “Guia sobre os requisitos de qualidade para o registro de produtos tópicos e transdérmicos”, que fornece orientações sobre o delineamento dos testes *in vitro*. No entanto, não trata especificamente de requisitos como membranas/ mucosas diferentes da pele.

A aroeira, pertencente à família Anacardiaceae, possui importância alimentar e outras propriedades tradicionalmente empregadas na medicina popular como, cicatrizante, estomáquicas e antidiarréicas, em virtude da presença de taninos e óleo-resinas (DUARTE; TOLEDO; OLIVEIRA, 2006). O Kronel®, objeto deste estudo, gel é um produto na forma farmacêutica gel vaginal, utilizado para o tratamento de vaginites e vulvovaginites, foi desenvolvido no NUDFAC em 1999 (Silva, 1999) e registrado na ANVISA no ano de 2001, sendo comercializado até os dias atuais. Ao longo dos anos, as legislações de registro de fitoterápicos sofreram alterações com o objetivo de adequar-se às exigências que assegurem a qualidade do produto.

Diante do acima exposto, o objetivo deste estudo é discutir a legislação de registro de fitoterápicos tópicos no decorrer de 20 anos, através da avaliação dos atributos de qualidade e performance de um fitoterápico de uso ginecológico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os atributos de qualidade e performance de um fitoterápico de uso ginecológico, disponível no mercado nacional há 20 anos, usando como parâmetro a legislação de registro formulações tópicas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Comparar as legislações de registro de fitoterápicos, avaliando suas mudanças no decorrer de 20 anos;
- Validar método de análise para quantificação do ácido gálico, a partir do produto gel vaginal à base de aroeira (Kronel[®]);
- Avaliar os atributos de qualidade do produto gel vaginal à base de aroeira (Kronel[®]), através da determinação do pH, viscosidade, espalhabilidade, reologia e estudo de liberacao *in vitro*;
- Avaliar os atributos de performance do produto gel vaginal à base de aroeira (Kronel[®]), em mucosa vaginal suína recém excisada, utilizando o ácido gálico como marcador;
- Realizar análise histológica de vagina suína recém excisada e pós aplicação do produto;
- Avaliar a segurança do produto gel vaginal à base de aroeira (Kronel[®]), através do uso de métodos alternativos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO DA REGULAMENTAÇÃO DE FITOTERÁPICOS NO BRASIL

Os medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade (BRASIL, 2014). Este conceito encontra-se na RDC No 26 de 13 de maio de 2014, legislação vigente sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

Esta resolução distingue as categorias de medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, sendo o último definido como aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que não necessitem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização (BRASIL, 2014).

Ao longo do tempo, o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil passou por cinco marcos regulatórios específicos: a Portaria nº 22, de 30 de outubro de 1967, do extinto Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia (SNFMF), a Portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995, da também extinta Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, e as RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000, RDC nº 48, de 16 de março de 2004, RDC nº 14, de 31 de março de 2010 e a atual RDC nº 13 de 26 de maio de 2014, publicadas pela Anvisa (BRASIL 1967; BRASIL 1995; BRASIL, 2000; BRASIL, 2004; BRASIL, 2006; BRASIL, 2010; BRASIL, 2014).

A Portaria nº 22, de 30 de outubro de 1967 foi o primeiro ato normativo a estabelecer normas para o emprego de preparações fitoterápicas no Brasil, e apesar de não ter o mesmo detalhamento técnico nas resoluções atuais, continha exigências como a identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrões de qualidade e identidade, provas de eficácia terapêutica e de segurança de uso, constituindo basicamente todos os aspectos pertinentes ao registro de um medicamento fitoterápico. Para comprovação da segurança e eficácia, fazia-se necessária a apresentação de resultados favoráveis de ensaios pré-clínicos e clínicos (BRASIL, 1967; NETTO et al., 2006; CARVALHO et al., 2008).

No início, as solicitações de registro de medicamentos fitoterápicos eram apresentadas ao órgão competente do Ministério da Saúde (MS) sem comprovação completa da qualidade, segurança e eficácia. A análise das solicitações de registros era restrita a processos meramente administrativos e cartoriais, devido a estrutura precária da vigilância sanitária, fazendo com que muitos medicamentos fitoterápicos fossem registrados e renovados repetidas vezes sem a

verificação desses requisitos (PERFEITO, 2012).

Apenas 28 anos após a publicação da portaria nº 22 de 1967, surgia o primeiro marco legal impactante; a Portaria SVS/MS nº 6 de 31 de janeiro de 1995, da Secretaria de Vigilância Sanitária. Esta portaria foi fortemente influenciada pelas orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS), de 1991, para que os países membros estabelecessem suas regulamentações sobre a fitoterapia, trazendo regulamentação própria para registro de fitoterápicos no Brasil, afim de assegurar medidas que garantissem segurança, eficácia e qualidade para esses produtos, com um rigor próximo ao exigido às demais classes de medicamentos. (OMS, 1991; BRASIL, 1995; DE OLIVEIRA D.R.; DE OLIVEIRA A.C.D; MARQUES, 2016).

Além disso, a Portaria impediu a inclusão de substâncias ativas isoladas, de origem natural ou sintética, em produtos fitoterápicos, fazendo com que muitas indústrias tivessem que optar pela alteração da formulação de determinados produtos ou deixar de classificá-los como “Produto Fitoterápico” (DE OLIVEIRA D.R.; DE OLIVEIRA A.C.D; MARQUES, 2016). De maneira mais semelhante às resoluções atuais, a Portaria nº 6 de 1995 estabeleceu prazos para a execução e comprovação da eficácia e segurança de medicamentos fitoterápicos, sendo estes 10 e 5 anos, respectivamente. O registro de associações de espécies vegetais era permitido desde que apresentassem ensaios de segurança e eficácia, estabilidade e que demonstrassem que os efeitos colaterais e reações adversas eram de intensidade igual ou menor que os de cada componente vegetal isoladamente (BRASIL, 1995).

A portaria SVS nº 06/1995 também classificou os medicamentos fitoterápicos em isentos de registro, novos, e similares. Os isentos de registro aplicavam-se àqueles produtos que fossem descritos na Farmacopéia Brasileira ou em outros códigos oficiais aceitos pela Secretaria de Vigilância Sanitária; os medicamentos fitoterápicos novos deveriam comprovar segurança e eficácia através de estudos toxicológicos e farmacológicos pré-clínicos e clínicos, enquanto os similares deveriam comprovar similaridade a outro medicamento fitoterápico já registrado (PERFEITO, 2012).

Como a Portaria SVS nº 06/1995 não surtiu os efeitos desejados, esta foi revogada e substituída pela RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. A RDC 17/2000 reforçou a preocupação com a eficácia e com os riscos do uso dos fitoterápicos, trazendo a possibilidade de comprovação de segurança e eficácia dos produtos por diferentes maneiras, levando-se em consideração o uso tradicional e os estudos científicos já realizados para as espécies vegetais (CARVALHO et al., 2008).

Houve a substituição pioneira do termo “Produto fitoterápico” por “Medicamento fitoterápico”, os quais foram divididos em três categorias: Medicamento Fitoterápico Novo, para o qual era exigida a apresentação de ensaios clínicos e pré-clínicos de segurança e eficácia, semelhante à Portaria SVS/MS nº 06/1995; Fitoterápico Tradicional, obtido a partir de planta medicinal de uso baseado na tradição popular, sem evidências, conhecidas ou informadas, de risco à saúde do usuário, cuja eficácia é validada através de levantamentos etnofarmacológicos e de utilização, documentações técnico-científicas ou publicações indexadas; e Medicamento Fitoterápico Similar, o qual deveria apresentar as mesmas especificações do medicamento fitoterápico de referência (BRASIL, 1995).

No que diz respeito à isenção, a RDC nº 17/2000 manteve os requisitos de submissão documental para avaliação de presença em monografia farmacopeica. O grande diferencial da RDC nº 17/2000 foi introduzir a relevância do conceito do uso tradicional e histórico de uso no momento do registro (NETTO et al., 2006). Havia 3 formas de comprovação da segurança e eficácia: a) por meio de levantamento bibliográfico que comprovasse ausência de risco tóxico ao usuário; ausência de grupos ou substâncias químicas tóxicas; indicação de uso episódica ou para curtos períodos de tempo; coerência com relação às indicações terapêuticas propostas; indicação para doenças consideradas leves e com finalidade profilática e comprovação de uso seguro por um período igual ou superior a 10 anos; b) por meio de levantamento em literatura técnico-científica, atingindo a pontuação mínima de seis pontos (PERFEITO, 2012; (DE OLIVEIRA D.R. ; DE OLIVEIRA A.C.D; MARQUES, 2016).

Seguindo a evolução na legislação sanitária, a RDC nº 17/2000 foi substituída pela RDC nº 48, de 16 de março de 2004, que disciplinou de maneira mais adequada os procedimentos para solicitação de registro de um novo produto. A partir desta resolução, era possível evidenciar quatro formas distintas de registro de fitoterápicos: 1- realizar os estudos para comprovação da eficácia e segurança; 2- demonstrar a tradicionalidade de uso; 3- selecionar espécie que integre a Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos; 4- demonstrar a segurança e a eficácia baseado na literatura científica (BRANDÃO; COSENZA; MOREIRA, 2006).

As diferentes classes de medicamentos fitoterápicos existentes foram extintas, mas as diferentes formas de comprovação de segurança e eficácia foram mantidas. Determinou-se o fim da isenção de registro, passando a valer a denominação única de fitoterápicos para aqueles anteriormente classificados em medicamentos fitoterápicos similares, novos e tradicionais (PERFEITO, 2012).

O fim dos fitoterápicos similares constituiu-se de certa forma, coerência técnica, pois os

estudos de bioequivalência e testes *in vitro*, que comprovam a correlação com a biodisponibilidade, ainda não são totalmente aplicáveis aos medicamentos fitoterápicos, visto que são misturas complexas, com diversos constituintes, e na maioria das vezes, a ação farmacológica se dá pelo sinergismo de seus constituintes e não pela ação de uma ou mais substâncias isoladas, como no caso dos medicamentos sintéticos (PERFEITO, 2012; LI et al., 2008). Outro acontecimento marcante foi a determinação do cumprimento das BPFC pela empresa fabricante do medicamento como parte essencial ao registro.

Revogando a RDC nº 48/2004, a RDC nº 14, de 31 de março de 2010 trouxe mudanças como: a) possibilidade de registro de algas e fungos multicelulares; b) possibilidade de substituir controle químico do marcador pelo controle biológico para testes validados *in vivo*, *ex vivo*, ou *in vitro*, para controlar a atividade; c) necessidade de avaliar ausência de aflatoxinas quando citado em monografia específica; d) demonstração de sistema de farmacovigilância pós-registro; e e) possibilidade da droga vegetal ser constituinte ativo no fitoterápico, se a eficácia clínica for provada (BRASIL, 2010).

A RDC nº 14/2010 foi substituída pela RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, legislação em vigor que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, e definiu Fitoterápico em duas categorias: Medicamentos Fitoterápicos (MF) - obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade; e Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF) - obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização (BRASIL, 2014).

Esta última Resolução estabeleceu os requisitos mínimos para o registro e renovação de registro de MF e para o registro, renovação de registro e notificação de PTF. É importante destacar que tanto MF como PTF são considerados medicamentos, possuindo os requisitos similares de fabricação e de qualidade, porém mais flexíveis para PTF. Também é importante perceber que o “registro de fitoterápicos” é obrigatório para a categoria dos MFs, enquanto os PTFs são passíveis de registro ou notificação.

O processo de registro de medicamentos tem o objetivo de disponibilizar medicamentos com eficácia, segurança e qualidade, de maneira a diminuir os riscos à população. Desta forma, a ANVISA estabelece requisitos mínimos de qualidade para a concessão de registro de medicamentos (BRASIL, 2019).

2.2 REQUISITOS DE QUALIDADE E PERFORMANCE DE PRODUTOS TÓPICOS

Atualmente, o arcabouço regulatório da ANVISA estabelece requisitos mínimos de qualidade para a concessão de registro de medicamentos. A RDC nº 200/2017, dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências (BRASIL, 2017). Entretanto, não há regulamentação que disponha de forma detalhada os critérios de qualidade aplicáveis ao registro de medicamentos tópicos e transdérmicos, os quais possuem certas particularidades.

Em se tratando especificamente de produtos tópicos, no ano de 2019, foi publicado pela ANVISA, o “Guia sobre os requisitos de qualidade para o registro de produtos tópicos e transdérmicos”, onde constam requisitos mínimos relacionados à tecnologia farmacêutica, expondo o posicionamento da Agência sobre os ensaios que podem ser aplicados no desenvolvimento, controle de qualidade, estudo de estabilidade e equivalência farmacêutica desses produtos. No mais, outros compêndios internacionais reconhecidos pela ANVISA, como a Farmacopeia Americana (USP) e Organização Europeia para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) e o Food and drug administration (FDA) podem ser utilizados no caso de avaliações complementares. (BRASIL, 2019).

No que trata dos requisitos de qualidade, alguns testes realizados são considerados universais, e aplicáveis a todos os produtos tópicos e transdérmicos. Dentre estes estão a) descrição/ aparência, capaz de discriminar alterações visuais no produto acabado, tais como mudanças na cor, separação de fases e cristalização; b) teor, quantificação do insumo farmacêutico; c) pH, importante, pois pode afetar as propriedades físico-químicas e a estabilidade do fármaco e dos produtos semissólidos, podendo influenciar a ionização do fármaco, a eficácia dos conservantes, a estabilidade da emulsão e o comportamento reológico; d) propriedades reológicas, avaliadas através da análise da curva de viscosidade em função da taxa de cisalhamento, confere uma avaliação e caracterização mais completa quando comparada a avaliação pontual da viscosidade (BRASIL, 2019).

Dentre os testes descritos no guia acima referido, encontra-se a análise de desempenho *in vitro* que pode ser realizada por meio de estudo de liberação ou de estudo de permeação, a depender do tipo de produto, via de administração e local de ação.

É importante que a liberação *in vitro* do fármaco seja analisada no processo de desenvolvimento da formulação, incluindo, no caso de registro de medicamento cópia

(genérico), a comparação de desempenho *in vitro* frente ao medicamento de referência. Ademais, a análise da liberação do fármaco pode ser uma ferramenta aplicável à avaliação da reprodutibilidade lote a lote do produto acabado, do controle de mudanças durante o ciclo de vida do medicamento e do estudo de estabilidade. É importante que a ausência de análise de desempenho *in vitro* nessas situações seja justificada e que tal justificativa seja correlacionada, principalmente, aos requisitos de qualidade e aos parâmetros de processo avaliados (BRASIL, 2019).

Para a análise da permeação *in vitro* pode ser empregada membrana proveniente de pele humana ou de pele de outros mamíferos. Sabe-se que o emprego de tecido animal na execução do método propicia “certa” variabilidade aos resultados. No entanto, com a minimização das falhas de desenvolvimento do método e execução deste, espera-se que a variabilidade seja baixa o suficiente, tornando a interpretação dos resultados confiáveis. Normalmente, o estudo de permeação *in vitro* é realizado em câmaras de difusão, sendo mais comum o uso da célula de difusão de Franz.

Estes testes podem determinar a difusibilidade do princípio ativo tanto em membranas artificiais quanto em pele animal, além de demonstrar o melhor perfil de liberação de acordo com a variabilidade da composição da formulação, como feito por Lira et al. (2004), ao desenvolver uma formulação geleificada à base de lapachol. Um trabalho realizado por Leal et al. (2008) utilizou células de Franz para realizar estudo de liberação *in vitro* de diferentes formulações tópicas de tretinoína utilizando membranas artificiais e também pele animal, verificando que pequenas alterações na composição foram capazes de modificar a estabilidade e o perfil de liberação do princípio ativo.

2.3 AROEIRA

O nome popular aroeira é uma forma abreviada da palavra araroeira, derivada de arara, proveniente do fato de a árvore ser o habitat natural destas espécies. É uma espécie de porte arbóreo, copa grande e caducifólia, tronco retilíneo e madeira de alta densidade (CARVALHO, 2003; MAIA, 2004). As aroeiras são espécies comuns na flora brasileira, e pertencem a família Anacardiaceae, de ocorrência pantropical. São caracterizadas por plantas floríferas, e ocorrem em países tropicais e temperados (DUARTE; TOLEDO; OLIVEIRA 2006).

No Brasil há muitas espécies da família Anacardiaceae chamadas de aroeira, como *Astronium fraxinifolium* Schott & Spreng. conhecida como aroeira do campo, aroeira-vermelha, *Myracrodruon urundeuva* Allemão conhecida como aroeira-do-campo ou aroeira-da-serra; *Schinus molle* L. DC., conhecida como aroeira salsa, aroeira salso, aroeira, aroeira folha de

salso, aroeira mole, corneiba, corneita, anacauíta, fruto de sabiá, aroeira periquita, pimenteiro, terebinto, bálsamo; e *Schinus terebinthifolius*, conhecida como aroeira, aroeira-mansa, aroeira-vermelha, aroeira-precocce, aroeira-pimenteira, aroeira-do-sertão, cambuí, coração-de-bugre e fruto-de-sabiá (DI-STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI; MATOS, 2002).

A família Anacardiaceae compreende aproximadamente 70 gêneros e 600 espécies, muitas delas de importância alimentar, e outras tradicionalmente empregadas na medicina popular como, cicatrizante, estomáquicas e antidiarréicas, pela presença de taninos e óleos-resinas (DUARTE; TOLEDO; OLIVEIRA, 2006).

Do ponto de vista químico, os gêneros da família Anacardiaceae mais frequentemente estudados são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirirae* e *Melanorrhoea*. O gênero *Schinus L.* é nativo da América do Sul e é encontrado principalmente na costa brasileira, e inclui 10 espécies (STRAPASSON; DOS SANTOS, MEDEIROS, 2002; CARVALHO et al., 2013).

2.3.1 *Schinus terebinthifolius* Raddi

A *Schinus terebinthifolius* Raddi pertence ao reino vegetal, de origem familiar ou divisão Tracheophyta, da classe Magnoliopsida, da ordem Sapindales, da família Anacardiaceae, gênero *Schinus*, espécie *terebinthifolius*, divisão da espécie Raddi (RIBAS et al., 2006).

Também conhecida como aroeira-da-praia, aroeira vermelha, pimenta-rosa e cambuí, *S. terebinthifolius* foi primeiro citada como medicinal por um naturalista holandês visitando o Nordeste no século XVII (BRANDÃO et al., 2008). Essa variação nos nomes populares é devido à aparência de seus frutos, que se assemelham a uma pequena pimenta rosa avermelhada, por isso, também chamados de pimenta rosa (GOMES et al., 2013). Apesar de ser mais frequente no litoral brasileiro, indo do Ceará até o Sul do país, *S. terebinthifolius* encontra-se também no interior (GILBERT; FAVORETO, 2011).

É possível observar ampla distribuição de ocorrência de *Schinus terebinthifolius* no território brasileiro compatível com diversos relatos de ocorrência natural como no Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e São Paulo (SANTOS et al., 1998; RODRIGUES; GALVAO, 2006; FERREIRA et al 2007; MENEZES et al 2009; RUAS et al, 2011).

2.3.1.1 Aspectos botânicos

Schinus terebinthifolius é uma árvore de porte médio, atinge de 5 a 10 metros de altura quando jovem, e 15 metros quando adultos (Figura 1). Possui copa larga, o tronco pode atingir de 30 a 60 cm de diâmetro com casca grossa, é geralmente tortuoso curto, com copa, larga, arredondada e pouco densa. (GILBERT; FAVORETO 2011; NEVES et al., 2016). A casca externa do tronco é escura, grossa e rugosa, áspera, sulcada e escamosa, que se desprende em placas irregulares. A interna é avermelhada, com textura fibrosa e odor característico com exsudação de terebintina (NEVES et al., 2016).

Figura 1 - Árvore de *S. terebinthifolius* Raddi jovem.



Fonte: NEVES et al., 2016.

As folhas são verde-escuras, compostas, oblongas a elípticas e com nervura proeminente na parte de cima do limbo. As flores, brancas ou de cor amarela (Figura 2), são pequenas e numerosas, agrupadas em inflorescências do tipo cacho (DUARTE et al, 2006). Os frutos são pequenos e globosos, com 4 a 5,5 mm de diâmetro e possuem coloração vermelha quando maduros, como mostrados na figura 3 (CARDOSO; SILVEIRA, 2010).

Figura 2 - Flores e folhas de *S. terebinthifolius* Raddi.



Fonte: DUARTE et al, 2006.

Figura 3 - Frutos de *S. terebinthifolius* Raddi.



Fonte: GILBERT; FAVORETO, 2011.

2.3.1.2 Composição química x propriedades biológicas

As principais substâncias encontradas na família Anacardiaceae são os triterpenos lipídios fenólicos e bioflavonóides (CARVALHO et al., 2013). No entanto, a literatura reporta outras classes de substâncias, como fenóis e derivados do ácido cinâmico (CORREIA et al., 2016). A análise química do extrato etanólico da casca de *S. terebinthifolius* revelou a presença de fenóis, triterpenos e antraquinonas. Por outro lado, o extrato etanólico das folhas mostrou resultados positivos para fenóis, flavonas, flavonóides, xantonas, leucoantocianidinas, flavanonas e esteróis livres (LIMA et al., 2006).

Estudos demonstraram que as folhas e casca de *S. terebinthifolius* são igualmente ricas

em taninos hidrolisáveis e óleos essenciais (JORGE; MARKMANN, 1996). Os óleos essenciais de *S. terebinthifolius* contêm α -e β -pineno, Δ 3-careno, limoneno, α e β -fandandreno, p-cimeno e terpinoleno como principais compostos, além de pequenas quantidades de álcoois mono e triterpenos, sesquiterpenos hidrocarbonetos e cetonas. Estudos evidenciaram que extratos de casca de folhas contém triterpenos e ácidos de triterpenos, respectivamente (LIMA et al., 2006).

Os taninos estão entre os principais compostos da casca de *S. terebinthifolius*. Inúmeras atividades biológicas como antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica e anticâncer são atribuídas aos taninos. Basicamente, as atividades biológicas destes compostos são devido a três propriedades: complexação com íons metálicos, efeito antioxidante e capacidade de complexação com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (SCALBERT, 1991; CARVALHO et al., 2013).

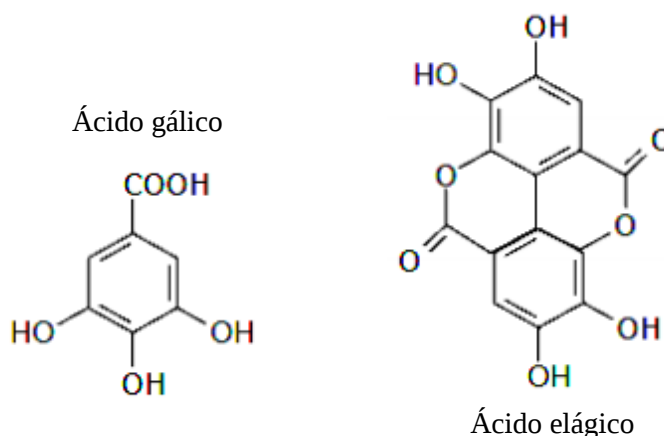
2.3.2 Taninos

As principais atividades biológicas de *S. terebinthifolius* estão relacionadas ao alto teor de taninos nela contido. Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse ecológico e econômico, com peso molecular variando de 500 a 3000 Dalton (MELLO; SANTOS, 2001).

Os taninos são classificados em dois grupos, segundo sua estrutura química: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são formados de ésteres de ácidos gálicos e elágicos glicosilados (Figura 4), formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (VICKERY & VICKERY, 1981; HELDT, 1997).

Normalmente, os taninos hidrolisáveis são divididos em galotaninos, que produzem ácido gálico após hidrólise, e em elagitaninos, que produzem ácido elágico após hidrólise (NASCIMENTO; MORAIS, 1996). A estrutura química do ácido gálico exibe intensa absorção na região ultravioleta, o que permite sua avaliação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (DE SOUZA, 2004).

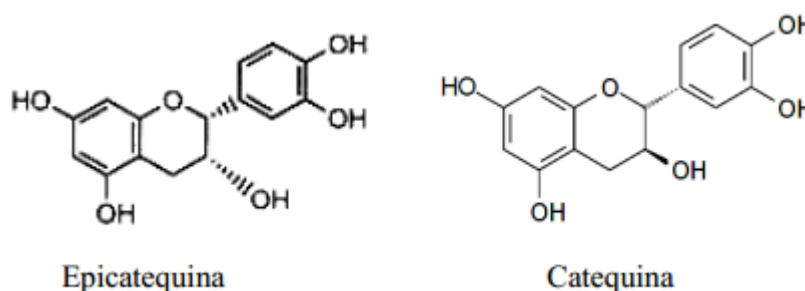
Figura 4 – Estruturas químicas de taninos hidrolizáveis.



Fonte: Pubchem. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>

Os taninos condensados são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, como a catequina ou a epicatequina, respectivamente unidas por pares de ligações C4→C8 ou C4→C (Figura 5). As proantocianidinas, assim denominadas provavelmente pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina, apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e a estereoquímica de seus compostos (HELDT, 1997; HEIL et al., 2002; MONTEIRO; ALBUQUERQUE; DE AMORIM, 2005).

Figura 5 – Estruturas químicas dos taninos condensados.



Fonte: Pubchem. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>

Dentre as atividades biológicas e farmacológicas atribuídas aos taninos estão: ação cicatrizante de feridas e queimaduras, proteção da mucosa gástrica, ação bactericida, fungicida, antiviral, antitumoral, tratamento de arteriosclerose e da artrite reumatoide, antidiarreica, hemostática e inibidora enzimática. Tais atividades estão relacionadas com a capacidade que os taninos possuem de formar complexos com macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos, e com íons metálicos, além de possuírem atividade antioxidante e sequestradora de radicais

livres (BRUNETON, 2001; MONTEIRO et al., 2005; MELLO; SANTOS, 2006).

Devido às atividades biológicas, as espécies vegetais como *Schinus terebinthifolius* que apresentam os taninos como metabólitos secundários despertam interesse para a produção de fitoterápicos. Diante disto, os taninos têm sido empregados como substâncias marcadoras para a avaliação da qualidade de diversas matérias-primas vegetais utilizadas na produção de medicamentos (SOARES, 2002; MELLO; SANTOS, 2006). Dessa forma métodos seguros e eficazes para a quantificação dessas substâncias na droga vegetal são imprescindíveis.

2.4 ÁCIDO GÁLICO (AG)

O AG, ácido 3,4,5-triidróxi-benzóico, é uma substância fenólica, intermediária do metabolismo secundário de plantas, originado através da rota biossintética do ácido chiquímico. É freqüentemente encontrado na natureza na forma de seu dímero de condensação, o ácido elágico, sendo ambos constituintes de taninos hidrolisáveis, dos quais são liberados por hidrólise ácida (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). Diferentes substituintes na porção ácida do AG permite a obtenção de ésteres com vários análogos e propriedades farmacológicas distintas (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013).

Ligado ao anel benzenico, o ácido gálico possui um grupo carboxílico e três grupos OH fenólicos nas posições 3, 4 e 5. Estes grupos apresentam uma constante de dissociação (pKa) de 4,4; 8,2; 10,7 e 13,1 (MELO et al, 2009). Um estudo realizado em 2012 por Polewski e colaboradores, avaliou as absorvâncias em UV-vis do AG solubilizado em soluções tamponadas com diferentes valores de pH. Sendo evidenciado o deslocamento do λ (comprimento de onda) de absorção do AG de 272 nm em pH 2,8 para 260 nm em pH 7.

O AG possui uma coloração amarelo esbranquiçada, apresentando-se na forma de cristais, com massa molecular de 170,12 g/mol, temperatura de fusão de 250 °C e solubilidade em água de 1.1% a 20°C (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013). Apresenta-se instável em temperaturas extremas, na presença de oxigênio ou luz (ROSA et al., 2013). Devido à presença de hidroxilas polarizadas de grupos fenólicos e carboxílicos, tanto intramoleculares como intermoleculares, o AG pode formar ligações de hidrogênio. No entanto, segundo o coeficiente de partição (LogP), que expressa a lipofilicidade relativa de uma substância, quanto maior o valor, maior é a lipossolubilidade de um determinado composto químico. O LogP do AG é de 0,89, bem menor que a maioria dos seus derivados galatos, podendo considerá-lo uma substância relativamente solúvel em água (BENNETT et al., 2004).

Conhecido por apresentar uma grande variedade de funções biológicas, o AG é um antioxidante conhecido, e estudos reportam sua atividade anti-inflamatória e antitumoral (KAWADA et al., 2001). Além disso, estudo realizado por Chanwitheesuk (2007) isolou o ácido gálico de extrato etanólico, e o definiu como uma substância ativa antimicrobiana, tendo exibido atividade contra *Staphylococcus aureus*.

2.5 GEL VAGINAL À BASE DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI (KRONEL®)

O Kronel® é um medicamento produzido pelo Laboratório Hebron®, desenvolvido no NUDFAC/ UFPE no ano de 1999, e está disponível no mercado sob registro da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desde 2001, sob numeração MS 1155700460046. Comercializado sob a forma farmacêutica gel ginecológico, o mesmo é obtido utilizando a casca da planta (*Schinus terebinthifolius*), e é recomendado no tratamento das cervicites, vaginites e cérvico-vaginites (Bula oficial do medicamento). Cada 6g do gel possui 0,45 gramas de *Schinus terebinthifolius*, totalizando 7,5% da planta nos 60 g da embalagem comercial (SILVA, 1999).

Um ensaio clínico randomizado testou a eficácia e tolerância do produto para o tratamento de vaginose bacteriana, e constataram que este é efetivo e seguro no tratamento deste tipo de infecção do órgão reprodutor feminino. Ainda, sugeriram que o Kronel® possuía potenciais efeitos benéficos para a flora vaginal, resultando no surgimento do medicamento de ação tópica (Kronel® gel) (AMORIM; SANTOS, 2003; SILVA; ALBUQUERQUE; SANTANA, 2004; GILBERT; FAVORETO, 2011).

Pesquisadores realizaram um estudo clínico randomizado utilizando Kronel®, comparando-o com metronidazol vaginal 0,75%, ambos fabricados pelo Laboratório Hebron®, para o tratamento de vaginose bacteriana, usado ao deitar, durante 7 noites. Como conclusão, a taxa de cura para a vaginose bacteriana usando o gel vaginal a 7,4% de *Schinus terebinthifolius* Raddi [17 mulheres (12,4%)] foi menor do que o índice obtido com gel vaginal de metronidazol 0,75% [79 mulheres (56,4%)]. Entretanto, os efeitos secundários foram pouco frequentes e não grave em ambos os grupos (LEITE et al., 2011).

Figura 6 - Gel vaginal à base de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Kronel®).



Fonte: <http://www.hebron.com.br/produto/produto_aberto/ginecologica/32>

2.6 MUCOSA VAGINAL

2.6.1 Mucosa vaginal humana

A vagina é descrita como um canal expansível, longitudinalmente em formato de L, fibromuscular, colapsado, mostrando na seção transversal uma configuração em H, com suas paredes anterior e posterior se conectando. Se estende do colo do útero para o vestíbulo, apresentando aproximadamente 7 – 10 cm de comprimento, mais de 4 cm de largura e 150 – 200 µm de espessura (MACHADO et al., 2015).

Por definição, a vagina é o órgão sexual feminino, e apesar de normalmente não conter glândulas, é chamada de mucosa. De fato, apesar de não possuir um papel secretor, a superfície epitelial vaginal é coberta por uma fina camada de fluidos incluindo secreções endometriais, cervicais e vestibulares, resíduos de urina e produtos de autólise celular, quantidades variáveis de transudato da parede vaginal (OWEN; KATZ, 1999). Adicionalmente, a composição do fluido vaginal varia de acordo com a idade, ciclo menstrual e condições de saúde (BULLA et al., 2010; MACHADO et al., 2015). Por exemplo, o pH vaginal é ácido em mulheres saudáveis durante o período reprodutivo, porém varia de acordo com os diferentes estágios do ciclo menstrual e também depende da frequência do coito, da quantidade do muco cervical presente na vagina e da quantidade de transudato (OWEN; KATZ, 1999).

A parede vaginal consiste de várias camadas de células: epitélio escamoso estratificado não-queratinizado, lâmina propria, camada muscular e túnica adventícia. A lâmina própria é

constituída por um tecido conectivo rico em vasos sanguíneos e linfáticos drenando para a veia ilíaca interna, justificando por que os produtos absorvidos evitam a circulação hepática como passagem inicial (K. VAN DE GRAFF, 2001; MACHADO et al., 2015;).

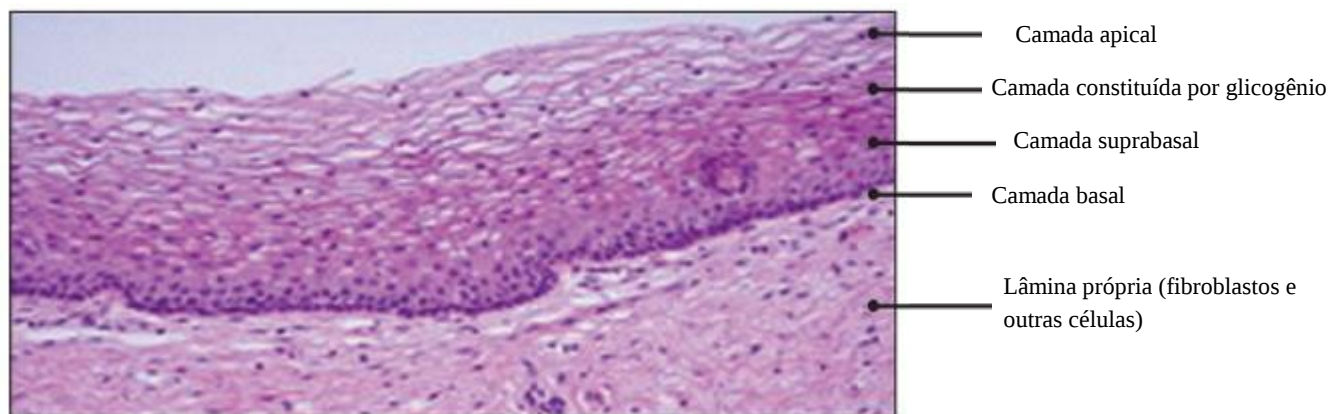
O epitélio escamoso estratificado não queratinizado, estabelecido em queratinócitos contendo glicogênio, mas também integrando outros tipos de células (como macrófagos e células de Langerhans), baseia-se na lâmina própria composta por fibroblastos, fibras elásticas e de colágeno, vasos, nervos e células de defesa, principalmente leucócitos polimorfonucleares e nódulos linfáticos ocasionais (COSTIN et al., 2011).

A inervação vaginal é proveniente de dois tipos de fontes: uma periférica que fornece um segmento do quarto inferior altamente sensível e uma rede de fibra autonômica na vagina superior, que é mais sensível a esticar do que aos estímulos dolorosos. Isso explica por que as mulheres não sentem desconforto ao usar sistemas de administração intravaginal contínua de medicamentos (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011).

Chamada também de superfície mucosa, a vagina não é uma verdadeira mucosa, devido à ausência de células secretoras. A denominação de “mucosa vaginal” consiste, na verdade, no conjunto da camada epitelial e lâmina própria, sendo a superfície humedecida da vagina proveniente principalmente das secreções glandulares do cérvix, da transudação vaginal, das glândulas de Bartholin e Skene, das células epiteliais esfoliadas e de urina residual (CARDOSO, 2013).

O pH vaginal que varia entre 3,5 – 4,5 durante a idade fértil de mulheres saudáveis, possui um papel importante na prevenção da proliferação de microrganismos patogênicos. Este meio ácido deve-se, principalmente, à ação das espécies de *Lactobacillus* presentes na flora vaginal de mulheres saudáveis, que transformam o glicogênio sintetizado pelas células epiteliais em ácido lático (CARDOSO, 2013).

Figura 7 - Histologia do epitélio vaginal humano.



Fonte: adaptado de COSTIN et al., 2011.

A via vaginal é usada principalmente visando efeito local, como no caso de infecções causadas por *Trichomonas* e *Candida albicans*, porém alguns fármacos são administrados visando efeitos sistêmicos. Em alguns casos a via vaginal oferece uma maior biodisponibilidade de fármacos quando comparada à via oral, visto que estes não sofrem metabolização hepática, entrando diretamente na corrente sanguínea (AULTON, 2005).

A aplicação vaginal é uma via comprovadamente vantajosa para aplicação de fármacos de ação local. Esta vantagem dá-se pela baixa incidência de efeitos adversos no tratamento local de infecções com antibacterianos e antiprotozoários, antifúngicos e antivirais, a recolonização vaginal com probióticos, entre outros (CARDOSO, 2013). No que diz respeito à absorção de fármacos, o epitélio da mucosa vaginal constitui a principal barreira de permeabilidade. Desta forma, as formulações devem ser obtidas de maneira que possa garantir a penetração desta barreira, sejam elas de ação local ou de ação sistêmica (CARDOSO, 2013).

Várias investigações feitas através de estudos *in vitro* demonstram este elevado potencial da mucosa vaginal como via de administração, provando que esta apresenta maior permeabilidade que a mucosa intestinal ou é tão permeável quanto a mucosa bucal a várias substâncias como a água e a vasopressina (INFARMED, 2011).

O mecanismo de transporte da maioria dos fármacos dá-se por difusão passiva. A extensão da velocidade de fluxo através da mucosa vaginal está diretamente relacionada com o tamanho molecular e hidrofobicidade das substâncias. Além disso, o pH vaginal pode influenciar o grau de ionização do fármaco, e consequentemente sua solubilidade; a viscosidade do fluido vaginal aumentada pode aumentar o tempo de retenção do fármaco ou tornar-se uma barreira de absorção à este, e grandes quantidades do fluido podem favorecer a dissolução do

fármaco, mas também aumentar o seu clearance vaginal (CARDOSO, 2013).

2.6.2 Mucosa vaginal suína

Estudos comparativos da mucosa vaginal humana e suína revelam semelhanças na morfologia entre as espécies, onde ambas possuem uma superfície de epitélio escamoso, extratificado, não-queratinizado. A semelhança na estrutura também se estende ao sistema celular dendrítico intra-epitelial, tendo sido demonstrado recentemente que a vagina suína contém células CD-1 e SLA-DR positivas, como descrito para a vagina humana (PATTON et al., 2000).

A nível ultraestrutural, o epitélio da vagina suína assemelha-se ao do humano, incluindo a organização das lamelas lipídicas intercelulares que compõem a barreira da permeabilidade. Dados sobre a composição lipídica do epitélio vaginal de porcas e humanos indicam uma concentração semelhantes de lipídeos, incluindo ceramidas, glicosil ceramidas e colesterol, os quais são componentes chave da barreira da permeabilidade. Essa semelhança em lipídios de barreira é refletida funcionalmente nos dados de estudos de permeabilidade. Utilizando água tritiada como padrão para comparação, estudos demonstraram que a permeabilidade da mucosa vaginal suína a 37° C é muito similar aos valores humanos. (SQUIER et al., 2008).

2.7 MODELOS DE ESTUDOS *EX VIVO*

Os requisitos éticos e regulamentares referentes aos participantes humanos de pesquisas para estudar os efeitos de agentes terapêuticos na mucosa genital levaram ao desenvolvimento de uma variedade de modelos experimentais, incluindo animais e células experimentais, e sistemas de cultura de tecidos e órgãos. O uso de tecidos humanos provenientes de biópsia ou de cirurgias evita algumas desvantagens dos modelos de cultura.

Em uma série de estudos, Thompson et al (2005), caracterizaram as propriedades de barreira da mucosa vaginal humana e descreveram sua permeabilidade *in vitro* a uma ampla variedade de compostos. Contudo, esses estudos usaram predominantemente amostras de indivíduos na pós-menopausa submetidos a histerectomia, que representam uma abundante fonte de tecido.

Uma ampla variedade de modelos animais é sugerida como substitutos adequados à pele humana e estes têm sido utilizados para avaliar a permeação percutânea de moléculas. Em caso de substituição da pele humana, é sugerida uma escala de modelo animal, que pode ser aplicada para avaliar a permeação percutânea de fármacos, que inclui: primata, rato, porco, porco da

índia e cobra (GODIN; TOUITOU, 2007). Vários estudos utilizaram ratos e camundongos de laboratório para estudos de irritação genital. No entanto, o revestimento vaginal espesso e queratinizado de roedores pode muito bem limitar a aplicação de resultados obtidos com este modelo para seres humanos (DAVIS; TRAVLOS; MCSHANE, 2001).

Entre os animais experimentais maiores, o porco tem a vantagem de ser notavelmente semelhante ao humano em termos de anatomia, fisiologia, metabolismo e patologia (SQUIER et al., 2008). A semelhança da vagina suína com a humana em termos de pH, secreções e resposta inflamatória recentemente levou D’Cruz et al (2005) propor o porco como modelo para estudos de irritação vaginal; esses autores demonstraram que o tratamento da vagina suína com cloreto de benzalcônio resultou em um aumento produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de neutrófilos e células mononucleares (D’CRUZ; ERBEK; UCKUN, 2005). Contudo, estudos com animais inteiros podem ser caros e logisticamente complexos. Para muitos propósitos, estudos *ex vivo* podem superar as desvantagens de usar animais intactos.

Material suíno geralmente está prontamente disponível em matadouros locais e é usado num período de até 3 horas pós morte, período durante o qual o tecido mucoso permanece vital e retém sua função de barreira, que é de pelo menos 12 horas (SQUIER; HALL, 1985; NICOLAZZO, 2003). Não há diferença significativa na permeabilidade à água ou estrutura histológica da mucosa oral humana e suína congeladas em nitrogênio líquido em comparação com tecido fresco (LESCH et al., 1989). Sassi et al (2004) demonstrou resultados semelhantes para a estrutura e permeabilidade da água da vagina humana, e Thompson et al (2001) demonstraram que a permeabilidade do tecido bucal humano e da mucosa vaginal, de outros compostos, não é alterada por congelamento.

Um estudo realizado por Pereira (2016) utilizou o método de permeação *ex vivo* com mucosa vaginal suína em células de difusão de Franz para avaliar a segurança de nanopartículas de quitosana para liberação prolongada de cetoconazol, através da quantificação do fármaco no líquido receptor. Os resultados apontaram a formulação como interessante para o tratamento tópico de infecções vaginais, uma vez que o fármaco encontrou-se na solução receptora em concentrações inferiores ao limite de quantificação do método analítico.

Da mesma maneira, através da análise de permeação em mucosa vaginal suína, um estudo realizado em 2017 na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, permitiu verificar as consequências de um uso prolongado quanto à segurança de um produto composto de nanopartículas contendo multicomponentes vegetais, desenvolvido para aplicação em produtos de uso íntimo feminino (OLIVEIRA et al., 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSUMOS

O Kronel® (gel vaginal), assim como as amostras de placebo, foram cedidos pelo laboratório farmacêutico Hebron LDTA. O Kronel® foram disponibilizados em dois lotes: nº 1807018 e 1606019. O ácido gálico obtido do fabricante Phytolab, Lote: 1371, 100% de pureza, foi utilizado como substância química de referência. Todos os solventes e reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico e as vidrarias previamente calibradas.

3.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS FORMULAÇÕES

3.2.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado através de pHmetro modelo PG 1800 (GEHAKA®), previamente calibrado com as soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0, à temperatura ambiente ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) em triplicata.

3.2.2 Determinação da espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada pelo método adaptado de Borghetti & Knorst (2006). Em uma placa de vidro disposta sobre papel milimetrado, aplicou-se 0,5 g das formulações em avaliação e sobre cada uma delas foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto de espalhamento, o diâmetro foi aferido em posições opostas e calculado o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se outras placas, sucessivamente, até um total de 5 placas, em intervalos de um minuto. Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, de acordo com a equação 1, abaixo:

$$Ei = \frac{d^{2\pi}}{4} \text{ (Equação 1)}$$

Onde, Ei = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm²); d = diâmetro médio (mm).

3.2.3 Determinação das propriedades reológicas

O comportamento reológico foi avaliado em viscosímetro rotacional da marca Rheology International®, e os dados foram posteriormente analisados com o software Microsoft® Excel.

A viscosidade aparente foi determinada à 50 rpm, enquanto as viscosidades relativas foram determinadas num gradiente de cisalhamento crescente e decrescente com velocidade de rotação de 10 a 100 rpm usando spindle S7 e temperatura de 25°C. O comportamento reológico dos produtos foi identificado a partir da construção do gráfico de viscosidade versus taxa de cisalhamento.

3.2.4 Determinação do teor de ácido gálico das formulações

Foi pesado 1,00 g do produto Kronel® Gel, e em seguida foi transferida a quantidade pesada para um béquer de 100 mL e adicionados 60 mL de solução diluente. A amostra foi extraída em banho ultrassônico por 30 minutos. O conteúdo do béquer foi transferido para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com q.s.p. de solução diluente e homogeneizado. Em seguida, filtrado para um vial usando filtro 0,45µm x 13mm diâmetro, ou equivalente. As amostras foram injetadas em triplicata em HPLC nas condições cromatográficas.

3.3 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DAS FORMULAÇÕES

3.3.1 Estudo de liberação in vitro

3.3.1.1 Preparo da membrana sintética hidrofílica

Foram utilizadas membranas hidrofílicas artificiais GV DURAPORE® em PVDF, com porosidade de 0,45 µm. A membrana foi previamente hidratada em água destilada por um período de 12 horas.

3.3.1.2 Montagem das células de Franz

O compartimento receptor das células de Franz foi completamente preenchido com solução receptora (água destilada). As membranas artificiais foram dispostas na célula de modo que ficassem em contato com a solução receptora sem a formação de bolhas. E no compartimento doador foi colocado 300 mg de cada formulação teste. O sistema foi mantido sob agitação magnética (300 rpm). As células foram mantidas em banho circulante a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.3.1.3 Coleta e Quantificação das Amostras

Alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 horas, o volume retirado durante as coletas foi repostado imediatamente com solução receptora. As amostras foram quantificadas através de cromatografia CLAE-UV conforme método já

descrito e utilizadas nos cálculos da quantidade real liberada (equação 2). As análises foram realizadas em sextuplicatas para cada formulação.

$$Q_{\text{real},t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad (\text{Equação 2})$$

Na qual:

$Q_{\text{real}, t}$ = quantidade real permeada referente ao tempo t ;

C_t = concentração obtida referente ao tempo t ;

V_r = volume de solução receptora (6 mL)

C_c = concentração da amostragem anterior

V_c = volume coletado

3.3.1.4 Análise da cinética de liberação *in vitro*

Para a avaliação da cinética de liberação de ácido gálico no sistema, o resultado foi compilado em gráficos de dispersão xy, característicos de três modelos de cinética:

- Ordem zero: quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus tempo (h);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus tempo (h);
- Higuchi: quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus raiz quadrada do tempo (h), conforme a equação 3:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \sqrt{t} + b \quad (\text{Equação 3})$$

A partir da análise de regressão linear, determinou-se o coeficiente linear (r) para cada modelo de cinética. O modelo que apresentou valor de r mais próximo a 1 foi selecionado. A taxa de liberação corresponde à inclinação (a) da porção linear do modelo de cinética selecionado (COSTA; LOBO, 2001).

3.3.1.5 Análise comparativa lote a lote

As taxas de liberação *in vitro* das formulações estudadas foram comparadas de acordo com o guia SUPACSS 1724 – que dispõe de alterações pós-registro para formas de dosagens semissólidas não-estéreis. Para ser considerado equivalente, o intervalo de confiança deve ser de 75 – 133.33%.

3.3.2 Estudo de permeação ex vivo

3.3.2.1 Seleção do meio receptor

A solubilidade do ácido gálico foi determinada mediante o preparo de dispersões contendo excesso de ácido gálico (30 mg). Nesse procedimento, ao excesso de ácido gálico foi adicionado 1 mL de diferentes meios receptores: tampão fosfato de sódio pH 4.5 e água ultrapura pH 5.

Essas dispersões foram homogeneizadas por meio de agitação à temperatura controlada ($37 \pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 24 horas e, em seguida, centrifugadas a 4.000 rpm durante 20 minutos. Em seguida, foi retirada uma alíquota do sobrenadante, diluída e filtrada em membrana filtrante 0,45 μm . A concentração de ácido gálico foi determinada por CLAE-DAD.

3.3.2.2 Seleção do meio extrator

Considerando a afinidade do ácido gálico pelos componentes da mucosa, diferentes procedimentos de extração e diferentes solventes e/ou misturas de solventes foram testados visando obter um maior percentual de extração do mesmo, que foi determinado através de CLAE-DAD.

3.3.2.3 Obtenção da mucosa vaginal

A vagina foi obtida a partir de porcas recém abatidas no matadouro local em Paulista, Pernambuco/ Brasil, e posteriormente limpas em água corrente. Com o auxílio de bisturis e tesouras, a mucosa vaginal foi excisada e acondicionada em soro fisiológico até a realização do experimento de permeação, por um período máximo de 2 horas.

3.3.2.4 Montagem das células de Franz

O compartimento receptor das células de Franz foi completamente preenchido com solução receptora (tampão fosfato pH 4.5). As mucosas vaginais suínas foram cortadas em seções de aproximadamente 2,5 cm² (tamanho suficiente para adequar-se as células de difusão de Franz), e foram dispostas na célula de modo que ficassem em contato com a solução receptora sem a formação de bolhas. No compartimento doador foi colocado 300 mg de Kronel® gel vaginal, com posterior fechamento das células. O sistema foi mantido sob agitação magnética (350 rpm). As células foram mantidas em banho circulante a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.3.2.5 Coleta e Quantificação das Amostras

Alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0 e 7,0 horas, e filtradas em membrana 0,45 µm, o volume retirado durante as coletas foi repostado imediatamente com solução receptora. As amostras foram quantificadas através de CLAE-UV, (método descrito no item 4.3.2) e utilizadas nos cálculos da quantidade real liberada (equação 1). As análises foram realizadas em sextuplicatas para cada formulação.

Ao final do estudo de permeação, as mucosas foram retiradas do equipamento para procedimento de coleta da formulação residual e limpeza das mesmas. Em seguida foi realizado o procedimento de retenção.

3.3.2.6 Estudo de retenção do ácido gálico

Após o procedimento de permeação (descrito no item 4.5), a formulação residual foi retirada mediante auxílio de uma espátula, transferidos para tubos com capacidade para 50 mL, e realizada a extração do ácido gálico conforme metodologia anteriormente descrita. A quantidade de ácido gálico extraída da formulação residual foi analisada por CLAE conforme descrito anteriormente, e expressa em quantidade $\pm$ desvio padrão. Em seguida foi utilizado de álcool isopropílico, para limpeza de formulação residual que ainda permaneceu na mucosa. Após o referido procedimento, o swab foi transferido para tubo com capacidade para 15 mL e realizada a extração do ácido gálico. A quantidade de ácido gálico extraída da formulação residual foi analisada por CLAE - UV conforme descrito anteriormente, e expressa em quantidade $\pm$ desvio padrão.

3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE-UV)

O método foi desenvolvido pelo INFAN (Indústria Química Farmacêutica Nacional S.A.), indústria responsável pela produção do Kronel[®]gel vaginal, e foi validado seguindo as orientações da RDC nº 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012) para métodos bioanalíticos. Os parâmetros avaliados foram a seletividade, efeito residual, linearidade, precisão e exatidão, e recuperação.

3.4.1 Soluções padrão

Para a validação do método foi preparada uma solução estoque a uma concentração de 50 µg/ ml de ácido gálico em metanol: água (10:90 v/v). A curva de calibração do ácido gálico foi preparada em solução 90:10 (água + ácido clorídrico a 37%: metanol) com as concentrações

de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 µg / mL.

3.4.2 Análise cromatográfica

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu® equipado com detector ultravioleta (UV). A separação foi realizada em uma coluna de fase reversa da marca Merck Purospher® STAR RP-18 endcapped (5µ) 250 x 4,6 milímetros e uma pré-coluna C18 de 4 x 4 mm (5 µm), a 35°C, o comprimento de onda utilizado foi 280 nm. Como fase móvel foi utilizada uma de solução 90:10 (H₂O + HCl: metanol), a um fluxo de 0,7 mL/ min e volume de injeção de 40 µl.

3.4.3 Validação do método bioanalítico

3.4.3.1 Seletividade

A seletividade do método bioanalítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (CASSIANO, 2009; BRASIL, 2012).

A avaliação da seletividade foi realizada de modo a verificar a interferência dos componentes da mucosa vaginal suína e do líquido receptor na resposta analítica sob as condições cromatográficas estabelecidas. Para sua análise foram utilizadas 6 amostras de mucosa vaginal suína, provenientes de animais distintos.

A seletividade foi verificada através da comparação do cromatograma das amostras branco com os cromatogramas da amostra acrescida dos analitos. As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras do LIQ (BRASIL, 2012).

3.4.3.2 Efeito residual

O efeito residual do método analítico deve ser demonstrado por meio da sua capacidade de gerar resultados precisos e exatos em nível do LIQ quando uma amostra muito concentrada (LSQ) é injetada imediatamente antes de uma de menor concentração. Esse é um aspecto típico de estudos cinéticos que tem um aumento de concentração seguido de uma diminuição desses valores. O efeito residual foi avaliado com a injeção de amostra branco imediatamente após a análise de um LSQ (CASSIANO, 2009).

3.4.3.3 Linearidade

Este parâmetro foi obtido através da construção de três curvas de calibração que foram preparadas através das seguintes amostras: brancos (metanol e tampão fosfato pH 4.5) e 8 (oito) amostras com concentrações diferentes do analito. A faixa linear de trabalho utilizada foi de 1-10 µg/mL.

A partir das respostas obtidas pela análise das replicatas das amostras, verificou-se a linearidade da curva de calibração através da equação da regressão linear, estabelecida pelo modelo dos mínimos quadrados e do coeficiente de correlação. Os resultados foram tratados de forma a verificar o erro padrão relativo de cada nível de concentração estudado, bem como pelo desvio padrão relativo entre as réplicas de cada nível de concentração (BRASIL, 2012).

3.3.3.4 Precisão e exatidão

Para a obtenção da precisão e exatidão, amostras de controle de qualidade (CQ) (LIQlimite inferior de quantificação, baixo – CQB, médio – CQM e alto – CQA) foram preparadas com cinco repetições cada e analisadas no mesmo dia (para estudos intracorrída) e em três dias diferentes (estudos intercorrída). Os resultados de precisão e exatidão são obtidos através da determinação do Desvio Padrão Relativo (DPR) e Erro Padrão Relativo (EPR) (BRASIL, 2012) conforme as equações 4 e 5, respectivamente, descritas a seguir:

$$DPR = \left(\frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média Experimental}} \right) * 100 \text{ (Equação 4)}$$

$$EPR = \left(\frac{\text{Concentração Média Experimental} - \text{Valor Nominal}}{\text{Valor Nominal}} \right) * 100 \text{ (Equação 5)}$$

Os valores dos CQs utilizados para cada fármaco foram de:

- LIQ =1; CQB=2, CQM=5 e CQA=8 µg/mL

3.4.3.5 Recuperação

A recuperação dos analitos reflete as condições de extração determinadas no preparado das amostras de um método bioanalítico. Matuszewski, Constanzer e Chavez (2003) propõem que a recuperação de um analito possa ser verificada através da comparação das áreas dos picos

do fármaco das amostras extraídas com as áreas dos picos do fármaco preparados em solução.

Uma área de mucosa vaginal de 1,77 cm² foi fortificada com solução metanólica de ácido gálico para uma concentração final de 60 ug/mL, após 1 hora de contato, a mucosa foi picotada com auxílio de uma tesoura e colocada em tubo contendo 1 mL de fase móvel (solução aquosa de ácido clorídrico a 37% e metanol 90:10) pH 2,5 a 70°C. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos, em seguida foram filtrados 0,5mL e quantificados conforme método desenvolvido.

3.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MUCOSA SUÍNA

A análise histológica foi conduzida utilizando mucosa vaginal suína fresca (branco), e mucosa vaginal suína após 6 horas de exposição ao Kronel® gel e placebo. O material coletado foi clivado e mergulhado em uma solução de formol a 10% neutro tamponado (NBF), permanecendo por 48 horas. Após esse procedimento, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo e ajustados para 5 µm. Assim, os cortes obtidos foram colocados em lâminas untadas com albumina e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C, por 24 horas para secagem. Os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.), e analisados em microscópio de luz, sob foco fixo e clareza de campo, utilizando os aumentos 40x e 100x. Foi realizada análise descritiva dos resultados obtidos (ALMEIDA et al., 2016).

As análises foram realizadas no laboratório de Saúde Translacional, localizado no Centro de Ciências Médicas na Universidade Federal de Pernambuco.

3.5 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA ATRAVÉS DA OPACIDADE E PERMEABILIDADE DA CÓRNEA BOVINA (BCOP)

A medida da opacificação da córnea é realizada com o auxílio de um opacitômetro, aparelho que determina a diferença de transmissão do fluxo luminoso entre a córnea a ser avaliada, fixando um valor numérico de opacidade. Já a medida de permeabilidade da córnea após aplicação do produto, é feita adicionando fluoresceína e verificando a sua passagem pela córnea, a partir da medida da densidade óptica (DO) do meio em 490 nm. Após obtenção dos valores de opacidade e permeabilidade, é possível calcular o índice de irritação in vitro (IVIS) pela seguinte equação: $IVIS = \text{valor médio de opacidade} + (15 \times \text{valor de DO a 490nm})$, os valores obtidos devem ser enquadrados na classificação contida na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio BCOP.

Pontuação <i>in vitro</i>	Classificação
≤ 3	Sem categoria
$>3 \leq 55$	Não determinado
> 55	Categoria 1

Fonte: OECD (2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DAS FORMULAÇÕES

4.1.1 Determinação do pH

O pH vaginal é um parâmetro muito importante envolvido na eficácia de um sistema de liberação de fármacos em nível de mucosa vaginal, apresentando uma significativa associação (NUNES et al., 2012).

A depender do pH da formulação, a absorção pelo endotélio pode ser prejudicada. No caso de tratamentos contra microrganismos vaginais, tais como *Gardnerella vaginalis*, o pH pode ser crucial para o êxito da terapêutica. Este microrganismo se desenvolve em pH acima de 4,5 e dificulta o desenvolvimento de *Lactobacillus sp*, o qual está presente na microbiota vaginal saudável (CATLIN, 1992). No caso das formulações estudadas, os valores de pH encontraram-se na faixa de 4.4 a 4.5, considerado dentro dos padrões de saúde vaginal (O'HANLON; MOENCH; CONE, 2013), conforme mostrado na tabela 2.

Tabela 2 – médios pH	Parâmetro	Kronel® (lote 1)	Kronel® (lote 2)	Placebo	Valores das
	pH ± SD	4,47±0,01	4,44±0,04	3,55±0,005	

formulações estudadas.

Fonte: autoria própria

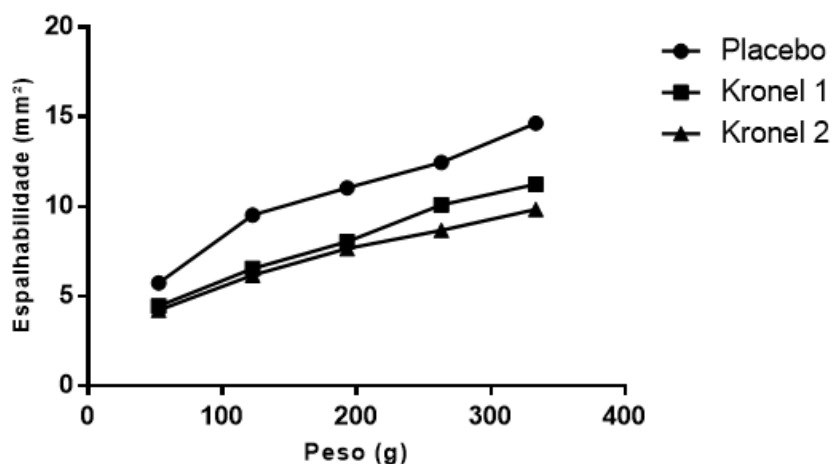
4.1.2 Determinação da espalhabilidade

A espalhabilidade consiste na propriedade de um semi-sólido se espalhar quando submetido a uma força sobre uma superfície, e é uma das características essenciais de formas farmacêuticas destinadas à aplicação tópica, pois está intimamente relacionada à aplicação destas formulações no local de ação (FELTKAMP, FUCKS, SUCKER, 1983; KNORST, 1991; NETZ; ORTEGA, 2014).

Os valores de espalhabilidade obtidos para os dois lotes distintos do Kronel® gel vaginal e o placebo, em função do peso adicionado estão representados na Figura 8.

A análise dos dados da espalhabilidade demonstrou ($p < 0,05$) que não existe diferença estatisticamente significativa entre os lotes de Kronel® gel vaginal e o placebo.

Figura 8 - Espalhabilidade das formulações estudadas.



Fonte: autoria própria

4.1.3 Propriedades reológicas

O estudo e a determinação das características reológicas é de grande e crescente importância para a indústria farmacêutica, visto que a consistência e a espalhabilidade dos produtos devem ser reproduzidos a cada lote, assegurando assim, a qualidade tecnológica do produto acabado. O estudo do comportamento reológico de produtos semi-sólidos permite caracterizar a facilidade com que o material seja retirado de um recipiente, avaliar a influência na espalhabilidade de preparações tópicas e controlar a qualidade de matérias-primas e produtos acabados (GOEBEL, 2012).

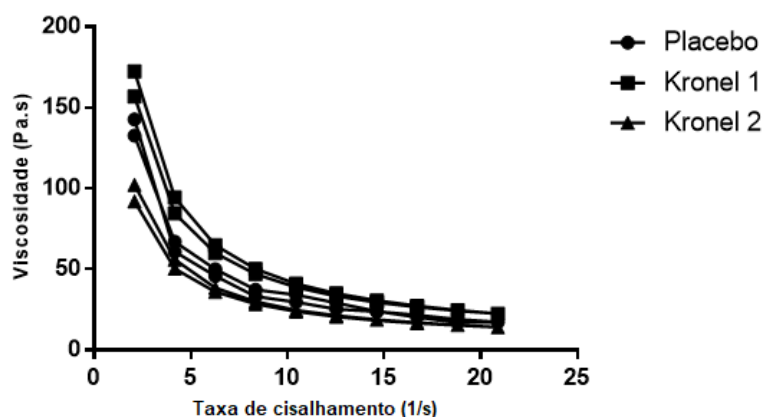
O estudo do comportamento reológico das formulações objeto do estudo foi avaliado por meio dos reogramas (Figura 9) e dos valores de viscosidade aparente (Tabela 3).

Tabela 3 - médios de				Valores
	Parâmetro	Kronel® (lote 1)	Kronel® (lote 2)	
	VA ± SD	40,56±1,29	35,68±0,50	23,73±0,28

viscosidade aparente das formulações estudadas (Pascal).

Fonte: autoria própria

Figura 9 - Reograma das formulações (lotes distintos de Kronel® gel e placebo).



Fonte: autoria própria

Os dados de viscosidade aparente (VA) das formulações estudadas, presentes na tabela 3, mostram que o placebo apresenta menor viscosidade quando comparado aos dois lotes de Kronel® gel vaginal, corroborando com os resultados de espalhabilidade, já que o placebo apresentou um valor maior para tal parâmetro.

Pela análise dos reogramas obtidos pode-se verificar que os lotes estudados e o placebo apresentaram comportamento não-newtoniano do tipo pseudoplástico, verificado na maioria dos produtos farmacêuticos e dermocosméticos (ANSEL; POPOVICH, 2000).

Nos fluídos com comportamento pseudoplástico, há um decréscimo da viscosidade em decorrência do aumento da taxa de cisalhamento, comportamento também referido como “shear thinning”, ou afinamento, significando que a resistência do material ao fluxo decresce e a energia requerida para manter este fluxo diminui, quando as taxas de cisalhamento aumentam. Este tipo de comportamento, apresentado nas formulações, é apropriado para produtos de aplicação tópica, refletindo na facilidade de aplicação (ANTONIO, 2007).

Além da pseudoplastia, as formulações apresentaram tixotropia, indicando que o produto tende a apresentar maior vida de prateleira (“shelf-life”), pois durante o armazenamento, este apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação. Além disto, formulações de uso tópico com caráter tixotrópico são almejadas, visto que estas se deformam durante a aplicação, tornando-se mais fluidas,

facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra (CORREA et al., 2005).

4.1.4 Determinação do teor de ácido gálico das formulações

Segundo as especificações do fabricante, esta estabelece que os valores de ácido gálico nas formulações de Kronel® gel vaginal estejam entre 0,27 mg e 0,33 mg por grama do gel. Após realização do teste para determinar o teor do ácido gálico nos dois lotes de Kronel®, foi possível observar que ambos encontram-se dentro do especificado, como mostrado na tabela 4 abaixo.

Tabela 4 - Valores médios de teor de ácido gálico nas formulações.

	Kronel® lote 1	Kronel® lote 2
Teor $\pm$SD	0,29 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,15

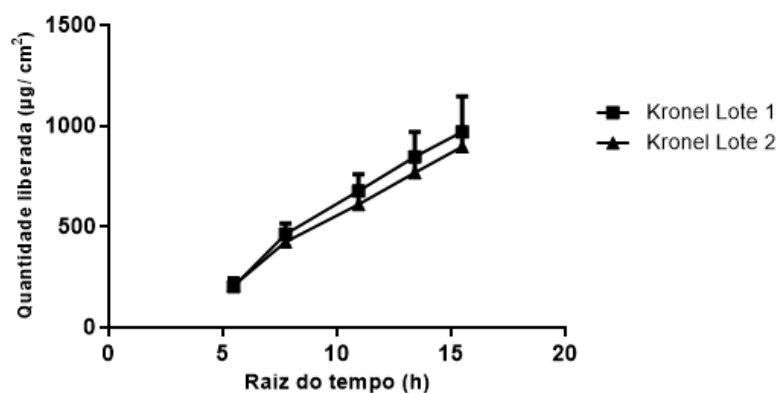
Fonte: autoria própria

4.2 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DAS FORMULAÇÕES

4.2.1 Estudo de liberação in vitro

Após avaliação das taxas de liberação apresentadas pelas formulações estudadas os perfis cinéticos foram classificados pelo modelo cinético de Higuchi. Os perfis de liberação das formulações também foram avaliados de maneira comparativa, entre os lotes distintos (Figura 10), utilizando a metodologia descrita no Guia SUPAC-SS 1724 (FDA, 1997; USP, 2014).

Figura 10 – Perfil de liberação das formulações de Kronel® gel vaginal.



Fonte: autoria própria

A liberação de fármacos pode ser definida de forma simplificada como o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo (CHOWDARY; RAJYALAKSHMI, 1987). O teste de liberação *in vitro* é uma ferramenta importante na indústria farmacêutica, e apresenta relevância no controle de qualidade em diferentes estágios do ciclo de vida de um medicamento (PRAÇA, 2010).

Durante a fase de produção, os testes *in vitro* são importantes para a liberação dos lotes e testes de estabilidade, visto que, as características de liberação devem manter-se constantes durante todo o período de validade do produto. Além disso, é uma ferramenta útil para avaliar o impacto de mudanças, como equipamentos e/ou local de fabricação sobre o produto (BRASIL, 2016; PRAÇA, 2010).

Após a avaliação estatística comparativa dos diferentes lotes de Kronel® gel vaginal, (Tabela 4), pode-se concluir que os dois lotes são considerados semelhantes, utilizando apenas 6 repetições. Desta forma, de acordo com o Guia 20 da Anvisa, é possível garantir a reprodutibilidade lote a lote do produto acabado.

Tabela 5 - Resultado estatístico comparativo entre os diferentes lotes de Kronel® gel.

Fármaco	Comparação	Valores-limite com IC de 90%	Conclusão
Ácido gálico	Kronel Lote 1 x Lote 2	83,84% - 104,86%	Semelhantes

Fonte: autoria própria

4.2.2 Estudo de permeação ex vivo

4.2.2.1 Seleção do meio receptor

O meio receptor selecionado foi o tampão fosfato de sódio pH= 4.5, obtendo solubilidade de 8,8 mg/mL a $\pm 37^{\circ}\text{C}$, suficientes para obtenção de condição sink durante todo o período do experimento.

4.2.2.2 Seleção do meio extrator

Após utilização de diferentes solventes e técnicas de extração, foi possível obter uma maior concentração de ácido gálico extraído a partir do metanol.

4.2.2.3 Estudo de retenção do ácido gálico

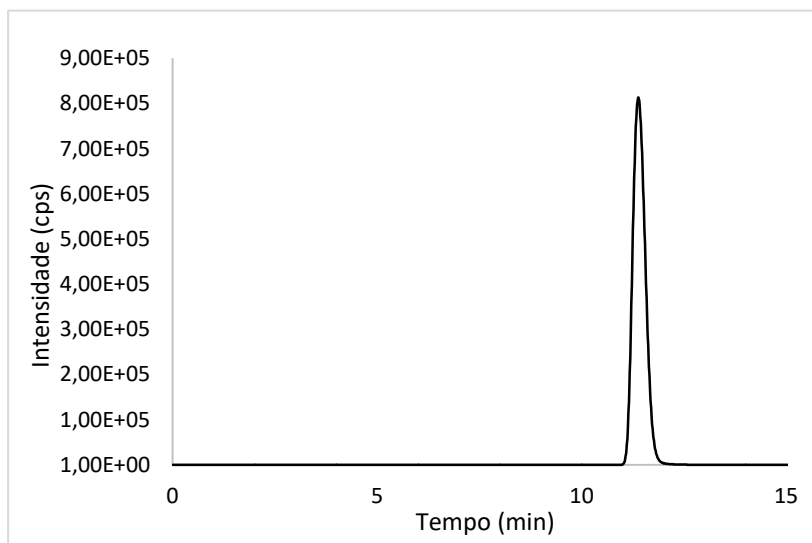
Após o tempo total do estudo de permeação, um total de aproximadamente 20% do ácido gálico foi encontrado na mucosa e o restante, na formulação residual, disponível para exercer ainda um efeito tópico.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE–UV)

4.3.1 Seletividade

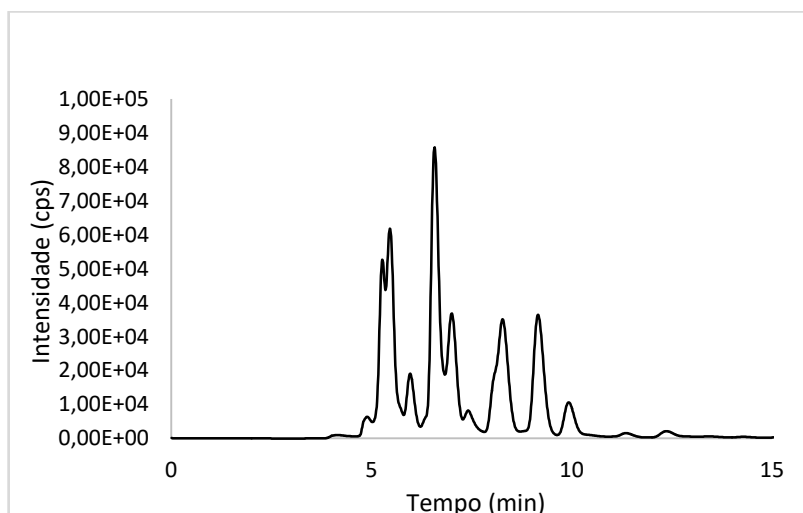
O método avaliado demonstrou necessária seletividade cromatográfica, sem interferência endógena da matriz nos tempos de retenção do analito. Os cromatogramas abaixo ilustram a ausência de picos cromatográficos em amostra branco de mucosa vaginal suína extraída (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Cromatograma do ácido gálico em solução metanólica (LIQ).



Fonte: autoria própria

Figura 12 - Cromatograma amostra branco da mucosa vaginal extraída.



Fonte: autoria própria

4.3.2 Efeito residual

Este parâmetro foi demonstrado através da comparação entre os cromatogramas de três amostras do branco, um obtido antes e dois depois da injeção do LSQ. Esse ensaio permitiu observar a ausência de picos residuais nos tempos de retenção do analito injetadas após o LSQ.

4.3.3 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro

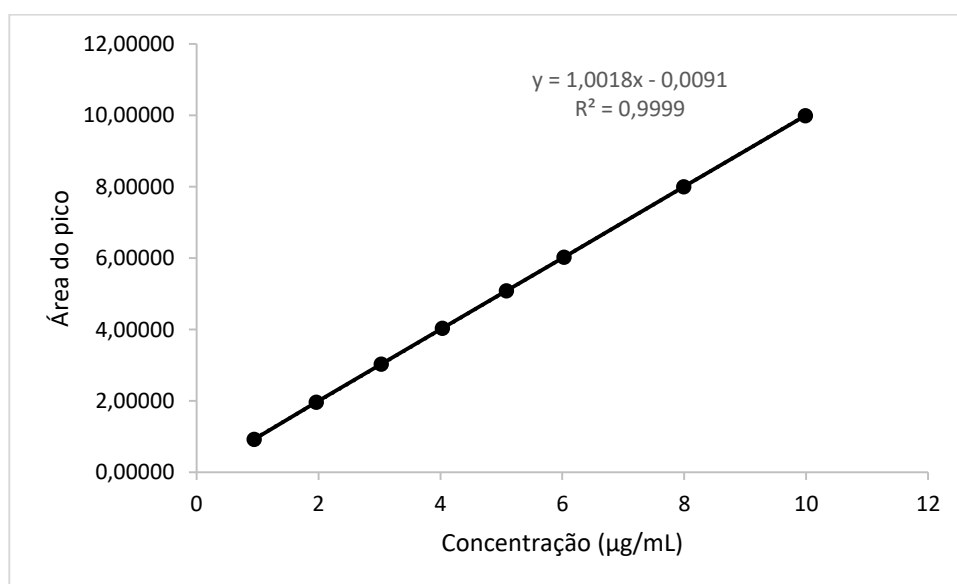
de um intervalo específico. Uma curva de calibração foi construída para o analito, contemplando oito concentrações, derivada da razão das áreas dos picos da substância de interesse. Foi obtida linearidade necessária para as amostras, com um coeficiente de determinação médio de 1. Os valores médios das concentrações para cada ponto, desvio padrão relativo e erro padrão relativo estão demonstrados na tabela 5, e a curva de calibração média na figura 13.

Tabela 6 - Valores médios de concentração de cada ponto da curva de calibração, DPR (%) e EPR (%).

Amostra	Média ($\pm$ DP)	Conc. Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)	EPR (%)
CCLIQ	$0,96 \pm 0,02$	1	2,04	-4,87
CC2	$1,96 \pm 0,009$	2	0,46	-1,78
CC3	$3,03 \pm 0,007$	3	0,22	1,02
CC4	$4,03 \pm 0,002$	4	0,06	0,92
CC5	$5,09 \pm 0,033$	5	0,65	1,8
CC6	$6,02 \pm 0,016$	6	0,27	0,47
CC7	$7,99 \pm 0,038$	8	0,48	-0,02
LSQ	$9,99 \pm 0,044$	10	0,44	-0,05

Fonte: autoria própria

Figura 13 – gráfico de linearidade a partir da curva de calibração média.



Fonte: autoria própria

4.3.4 Precisão e exatidão

A verificação da precisão e exatidão, intracorrida e intercorridas, foi realizada através da análise de 5 (cinco) replicatas de cada uma das amostras LIQ, CQB, CQM e CQA em 3 (três) corridas em dias diferentes.

Obtiveram-se as concentrações das injeções de cada ponto e a partir destas foram calculados o DPR (Equação 2) para demonstração da precisão e o EPR (Equação 3), para demonstração da exatidão conforme apresentados na tabela 6.

Tabela 7 - Precisão (DPR %) e Exatidão (%) do método bioanalítico.

Analito	CQs	Conc. Nominal	Precisão (DPR%)		Exatidão (EPR%)	
			Intrac.	Interc.	Intrac.	Interc.
Ácido gálico	LIQ	1	5,99	4,21	-9,15	-7,86
	CQB	2	1,98	0,91	-1,14	-0,37
	CQM	5	0,15	0,83	1,13	1,17
	CQA	8	0,15	0,71	0,11	-0,29

Fonte: autoria própria

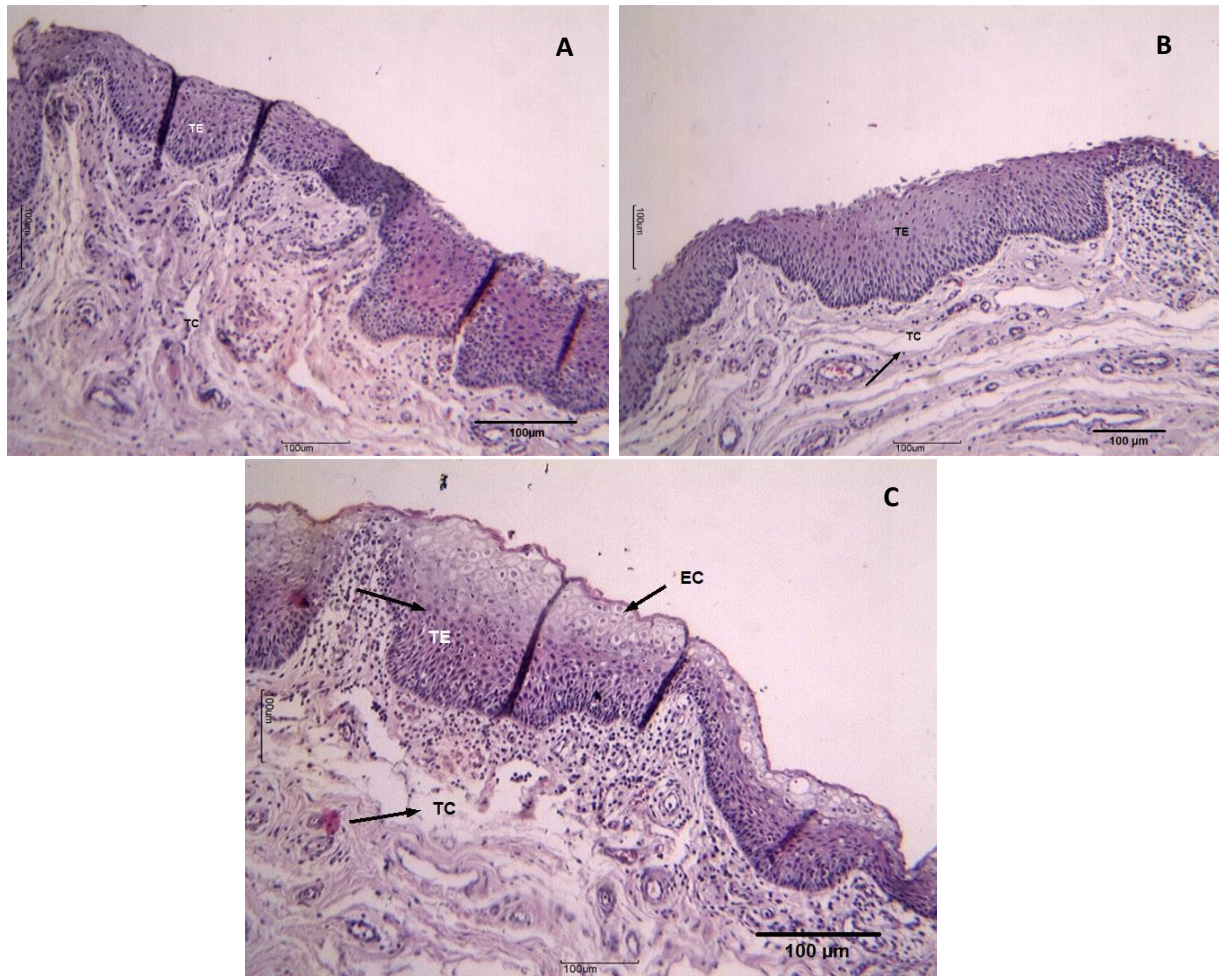
4.3.5 Recuperação

A recuperação do ácido gálico a partir da mucosa, utilizando a metodologia acima descrita foi de 31,16%.

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MUCOSA SUÍNA

Ficou evidenciado que o tecido epitelial (TE) do grupo Kronel® (Figura 14 C) encontra-se mais espesso quando comparado ao mesmo tecido dos grupos branco (Figura 14 A) e placebo (Figura 14 B). Além disso, as células do estrato córneo (EC) encontram-se vacuolizadas e com núcleo bem evidenciado. O tecido conjuntivo (TC) dos três grupos encontra-se tortuoso e desorganizado, apresentando áreas espaçadas entre as fibras, no entanto é possível observar uma acentuação nos grupos placebo e Kronel®. Não foram observadas células inflamatórias. Não há evidências aparentes de alterações nos tecidos epitelial e conjuntivo do grupo Kronel®.

Figura 14 - Cortes histológicos em aumento de 100x: (A) mucosa vaginal suína fresca (B) mucosa vaginal suína após aplicação do placebo (C) mucosa vaginal suína após licação do Kronel gel.



Fonte: autoria própria

As alterações observadas na mucosa vaginal suína são características de alterações causadas por taninos, independente se são de origem química ou biológica (VALOTTO et al., 2011). De acordo com um estudo feito por Valotto et al (2011), que avaliou as alterações ultra estrututrais no mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* à uma fração rica em taninos de uma espécie vegetal, os principais efeitos foram a degeneração celular, vacuolização citoplasmática, núcleos irregulares, alteração das microvilosidades, núcleos irregulares e deslocamento das células da lâmina basal. A vacuolização citoplasmática pode demonstrar a aceleração do processo de lise celular provocado pelo efeito tóxico das substâncias analisadas.

No entanto, apesar de tais achados, não se verifica a existência de quaisquer alterações que indiquem a perda de integridade da mucosa após a adição do produto.

4.5 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA ATRAVÉS DA OPACIDADE E PERMEABILIDADE DA CÓRNEA BOVINA (BCOP)

Para determinar o grau de irritabilidade de várias substâncias e produtos, os testes de irritação ocular e cutânea foram descritos inicialmente por John H. Draize (DRAIZE et al., 1944). No entanto, estes testes, além de causar sofrimento, utilizam muitos animais (OLIVEIRA et al., 2012).

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados para obtenção de métodos *in vitro*, que possam substituir testes em animais. O teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP) é um método *in vitro* reconhecido internacionalmente para avaliação de potencial irritante (ICCVAM, 2010; WILSON et al., 2015), e aceito para fins regulatórios no Brasil pela ANVISA (BRASIL, 2014). Todos os tipos de substâncias, incluindo formulações podem ser avaliadas.

De acordo com os resultados do BCOP, mostrados na tabela 7, o Kronel® encontra-se na categoria 1, irritante, e nenhuma predição pode ser feita para o placebo. Segundo a OECD, os fatores críticos do teste BCOP estão relacionados com a capacidade de assegurar que a substância teste cubra adequadamente a superfície epitelial e que esta seja adequadamente removida durante as etapas de lavagem, o que pode justificar a classificação do Kronel® como irritante severo, já que este possui uma coloração intensa e difícil de ser removida da córnea quando da realização do teste.

Outra possibilidade pode ser justificada pela diferença entre os valores de pH da formulação e da mucosa ocular. Apesar dessas diferenças, os tecidos oculares e vaginal possuem algumas semelhanças (ambos tratando-se de mucosa) como: estruturais, de composição e imunológicas, podendo o teste de BCOP ser utilizado como uma triagem neste tipo de investigação (NESBURN, 2006; WATKINS, 1986).

Tabela 8 - Resultados do teste BCOP (média $\pm$ D.P).

	BCOP	Classificação
Kronel®	137,315 $\pm$ 25,10	Categoria 1
Placebo	36,69 $\pm$ 36,06	Não definido

Fonte: autoria própria

5 CONCLUSÃO

Ao realizar a comparação entre as legislações que regulamentaram o registro de fitoterápicos ao longo de 20 anos, foi possível observar um aumento no rigor das exigências adicionadas à cada uma delas, obrigando portanto os fabricantes a se adequarem as normas, de modo a garantir uma maior segurança para o consumidor final. A tecnologia mostrou-se uma aliada no cumprimento de tais exigências, visto que algumas avaliações passaram a ser realizadas de maneira mais prática e rápida, no entanto, exigindo equipamentos, ferramentas e treinamento mais específicos.

Anteriormente à realização dos testes de qualidade e performance do produto, todos os parâmetros analíticos foram testados, de maneira que o método analítico desenvolvido pelo fabricante do produto foi validado, tendo sido comprovados sua seletividade, linearidade, precisão e exatidão de acordo com a RDC nº 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Após a avaliação dos requisitos da qualidade e de performance do Kronel[®] gel vaginal, foi possível concluir que, de acordo com os requisitos exigidos para uma formulação de ação local, o Kronel[®] foi considerado um produto com qualidade farmacêutica e seguro para o uso pretendido, visto que foi reprodutível lote a lote, o ácido gálico não permeou a mucosa, e a formulação apresentou características compatíveis com a via de administração, sem causar alterações significativas na mucosa avaliada.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCAO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B*, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.
- ALMEIDA, W. M.; FRAGA, K. B.; AGUIAR JUNIOR, F. C. A.; MAGALHÃES, C. P. Análise histológica do trato intestinal do *Caracara plancus* (Miller, 1777). *Ciência Animal Brasileira*, v. 17, n. 3, p. 425-434, 2016.
- AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. *RBGO*, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALEN JR, Loyd V. Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. In: *Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 2000. p. 568-568.
- ANTONIO, M. E. C. O. Permeação cutânea in vitro como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.
- AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. 677p.
- BENNETT, C. J.; CALDWELL, S. T.; MCPHAIL, D. B.; MORRICE, P. C.; DUTHIE, C. G.; HARTLEY, R. C. Potential therapeutic antioxidants that combine the radical scavenging ability of myricetin and the lipophilic chain of vitamin E to effectively inhibit microsomal lipid peroxidation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 12, n. 9, p. 2079–98, 2004.
- BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Development and evaluation of physical stability from O/W lotions containing sunscreens. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 4, p. 531-537, 2006.
- BRANDÃO M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn.*; v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.
- BRANDÃO M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P.; MONTE-MÓR, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008.
- BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº 18, de 24 de Setembro de 2014. Diário Oficial da União 25 de setembro de 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14 de 30 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Anvisa, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. Anvisa, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U. 22 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 73 de 7 de abril de 2016. Dispõe sobre mudanças pós-registro, cancelamento de registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos e dá outras providências. Anvisa, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 200 de 26 de dezembro de 2017. Dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Anvisa, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995. Institui e normatiza o regulamento e produtos fitoterápicos junto à Secretaria de Vigilância Sanitária. (1995).

BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. (2004).

BRASIL. Portaria nº 22, de 30 de outubro de 1967. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas. Diário Oficial União. 16 nov 1967.

BRUNETON, J. Farmacognosia – Fitoquímica Plantas Medicinales. 2 ed. España: Editorial Acríbia S. A, 2001.

BULLA, R.; DE SETA, F.; RADILLO, O.; AGOSTINIS, C.; DURIGUTTO, P.; PELLIS, V.; DE SANTO, D.; CROVELLA, S.; TEDESCO, F. Mannose-binding lectin is produced by vaginal epithelial cells and its level in the vaginal fluid is influenced by progesterone. *Molecular immunology*, v. 48, n. 1-3, p. 281-286, 2010.

CAMPOS, R. et al. The rabbit vagina as an in vivo model for vaginal fenticonazole permeability and toxicity. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, v. 94, p. 14-18, 2018.

CARDOSO, C. A. O. Estudo da permeação vaginal de Clotrimazol pelo método de Ussing chambers. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2013.

CARDOSO, J. H.; SILVEIRA, J. V. da L. Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

CARLSTRÖM, K.; PSCHERA, H.; LUNELL, N. O. Serum levels of oestrogens, progesterone, follicle-stimulating hormone and sex-hormone-binding globulin during simultaneous vaginal administration of 17β -oestradiol and progesterone in the pre-and post-menopause. *Maturitas*, v. 10, n. 4, p. 307-316, 1988.

CARVALHO J. C. T, GOSMANN, G; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS., p. 519-535, 2004.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S.; Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn*, v. 18, n. 2, p. 314 – 319, 2008.

CARVALHO, A. C. B.; LANA, T. N.; PERFEITO, J. P. S.; SILVEIRA, D. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. *Journal of ethnopharmacology*, v. 212, p. 29-35, 2018.

CARVALHO, E.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Flow nephelometric analysis of proteintannin interactions. *Analytica Chimica Acta*, v. 513, n.1, p. 97-101, 2004.

CARVALHO, M. G.; MELO, A. G. N.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 15, n. 1, p. 158-169, 2013.
CARVALHO, P. E. R. *Espécies arbóreas brasileiras*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Revista Química Nova*, São Carlos, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CATLIN, B.W. *Gardnerella vaginalis*: Characteristics, Clinical Considerations, and Controversies. *Clinical Microbiology Reviews*, v.5, n.3, p. 213-237; 1992.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D., RAKARIYATHAM, N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry*, v. 100, n. 3, p. 1044-1048, 2007.

CHOUDHURY, A.; DAS, S.; KAR, M. A review on novelty and potentiality of vaginal drug delivery. *Int J PharmTech Res*, v. 3, n. 2, p. 1033-1044, 2011.

CHOWDARY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. *East Pharm*, v. 30, p. 51-4, 1987.

CORREA, NÁGILA MALUF; CAMARGO JUNIOR, FLÁVIO BUENO; IGNACIO, ROSA FERNANDA AND LEONARDI, GISLAINE RICCI. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.41, n.1, pp. 73-78, 2005.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies *Anacardiaceae*. *Química Nova*, v. 29, p. 1287-1300, 2006.

- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Influence of dissolution medium agitation on release profiles of sustained-release tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 27, n. 8, p. 811-817, 2001.
- COSTIN, G.; RAABE, H. A.; PRISTON, R.; EVANS, E.; CURREN, R. D. Vaginal irritation models: the current status of available alternative and in vitro tests. *Alternatives to Laboratory Animals*, v. 39, n. 4, p. 317-337, 2011.
- D'CRUZ, O. J.; ERBECK, D.; UCKUN, F. M. A study of the potential of the pig as a model for the vaginal irritancy of benzalkonium chloride in comparison to the nonirritant microbicide PHI-443 and the spermicide vanadocene dithiocarbamate. *Toxicologic pathology*, v. 33, n. 4, p. 465-476, 2005.
- DAVIS, B. J.; TRAVLOS, G.; MCSHANE, T. Reproductive endocrinology and toxicological pathology over the life span of the female rodent. *Toxicologic pathology*, v. 29, n. 1, p. 77-83, 2001.
- DE LIMA, J. A.; PAINES, T. C.; MOTTA, M. H.; WEBER, W. B.; DOS SANTOS, S. S.; CRUZ, L.; DA SILVA, C. B. Novel Pemulen/Pullulan blended hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapsules: Evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation. *Materials Science and Engineering: C*, v. 79, p. 886-893, 2017.
- DE OLIVEIRA, D. R.; DE OLIVEIRA, A. C. D.; MARQUES, L. Cs. O estado regulatório dos fitoterápicos no Brasil: Um paralelo entre a legislação e o mercado farmacêutico (1995–2015). *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, v. 4, n. 4, p. 139-148, 2016.
- DE SOUZA, Tatiane Pereira de. Desenvolvimento tecnológico e otimização de formas farmacêuticas sólidas contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L.(Euphorbiaceae). 2004. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- DI-STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002. p. 340-50.
- DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 82, 377–390, 1944.
- DUARTE, M.; TOLEDO, M. da G.; DE OLIVEIRA, R. La B. Diagnose morfoanatômica de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). *Visão Acadêmica*, v. 7, n. 2, 2006.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological research*, v. 112, p. 4-29, 2016.
- FELTKAMP, H.; FUCKS, P.; SUCKER, H. Pharmazeutische qualitaet skontrolle. Stuttgart: Georg Thieme, p. 714-735, 1983.
- FERREIRA, W. C.; BOTELHO, S. A.; DAVIDE, A. C.; FARIA, F. M. R. Avaliação do crescimento do estrato arbóreo de área degradada revegetada à margem do Rio Grande, na Usina Hidrelétrica de Camargos, MG. *Revista Árvore*, v. 31, n. 1, p. 177-185, 2007.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Schinus terebinthifolius* Raddi. Revista Fitos, v.06, n. 1, p. 43-56, 2011.

GODIN, B., TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*. V. 59 p. 1152–1161, 2007.

GOEBEL, K. Estudo de liberação in vitro do Diclofenaco dietilamônio em especialidades farmacêuticas. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GOMES, L. J.; SILVA-MANN, R.; MATTOS, P. P.; RABANI, E. R. C. Pensando a biodiversidade: aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI.). São Cristóvão: Ed. UFS, 2013, 372 p.

HEIL, M.; DELSINNE, T.; HILPERT, A.; SCHÜRKENS, S.; ANDARY, C.; LINSÉNMAIR, E. K.; SOUSA, M.; MCKEY, D. Reduced chemical defence in ant-plants? A critical re-evaluation of a widely accepted hypothesis. *Oikos*, v. 99, n.3, p. 457 – 468, 2002.

HELDT, H.; *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, University Press: Oxford, 1997.

ICCVAM. Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication 10-7553. ResearchTriangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2010.

INFARMED, *Prontuário Terapêutico*, 2011.

JORGE, L. I. F.; MARKMANN, B. E. O. Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). *Revista De Ciências Farmacêuticas*, v. 17, p. 139-45, 1996.

K. van De Graff. *Human anatomy*. McGraw-Hill, Europe, 1998.

KAWADA, M. et al. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anti-cancer drugs*, v. 12, n. 10, p. 847-852, 2001.

KNORST, M. T. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides*. 1991. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 1991.

KOWADA, M. et al. Antitumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anti-Cancer Drugs*, v. 12, n.10, p. 847-852, 2001.

LEAL, L. B. et al. Desenvolvimento tecnológico de preparações tópicas de isotretinoína. *Rev. Bras. Farm*, v. 89, n. 4, p. 327-332, 2008.

LEITE, S. R. R. F.; AMORIM, M. M. R.; SERENO, P. F. B.; LEITE, T. N. F.; FERREIRA, J. A. C.; XIMENES, R. A. A. Randomized clinical trial comparing the efficacy of the vaginal use of metronidazole with a Brazilian pepper tree (*Schinus*) extract for the treatment of bacterial vaginosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, n. 3, p. 245-252, 2011.

LESCH, C. A.; SQUIER, A. C.; WILLIAMS, D. M.; SPEIGHT, P. The permeability of human oral mucosa and skin to water. *Journal of dental research*, v. 68, n. 9, p. 1345-1349, 1989.

LI, S.; HAN, Q.; QIAO, C.; SONG, J.; CHENG, C. L.; XU, H. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese medicine*, v. 3, n. 1, p. 7, 2008.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENETJ, J.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, p. 137-47, 2006.

LIRA, A. A. M. et al. Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação in vitro. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 1, p. 35-41, 2004.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. *European journal of medicinal chemistry*, v. 60, p. 233-9, fev. 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2002. 512p.

MACHADO, R. M.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; GASPAR, C. MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Advanced drug delivery reviews*, v. 92, p. 14-26, 2015.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. 1. ed. São Paulo: D&Z, 2004. 413 p.

MARQUES, L. C.; SOUZA, C. M. Pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos: Relatos de experiência em indústria farmacêutica nacional. *Revista Fitos*, v. 7, n. 01, 2013.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical chemistry*, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 6. ed. rev. ampl., Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2006.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. Em *Farmacognosia: da planta ao medicamento*; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

MELO, R.; LEAL, J. P.; TAKÁCS, E.; WOJNÁROVITS, L. Radiolytic degradation of gallic acid and its derivatives in aqueous solution. *Journal of hazardous materials*, v. 172, n. 2-3, p. 1185-92, 2009.

MENEZES, C. M.; AGUIAR, L. G. P. A.; ESPINHEIRA, M. J. C. L.; DA SILVA, V. I. S. Florística e fitossociologia do componente arbóreo do município de Conde, Bahia, Brasil. *Revista Biociências*, v. 15, n. 1, 2009.

- MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; AMORIM, E. L. C.; ARAUJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. *Revista Árvore*, Viçosa, v.29, n.6, p 999-1005, 2005.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; DE AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.
- NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Polifenóis da madeira de *Eucalyptus grandis*. Parte 1: análise por espectroscopia e cromatografia líquida. *Ciência & Engenharia*, v. 5, n. 2, p. 13-18, 1996.
- NESBURN, A. B. et al. Topical/mucosal delivery of sub-unit vaccines that stimulate the ocular mucosal immune system. *The ocular surface*, v. 4, n. 4, p. 178-187, 2006.
- NETTO E. M.; SHUQAIR N.; BALBINO E. E.; CARVALHO A. C. B. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. *Revista Fitos*, v.1, n.3, p. 9-17, 2006.
- NETZ, Paulo; ORTEGA, George. Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. Porto Alegre: ArtMed Editora, 2014.
- NEVES, E. J. M.; SANTOS, A. M.; GOMES, J. B.; RUAS, F. G.; VENTURA, J. A. Cultivo da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para produção de pimenta-rosa. Colombo: Embrapa Florestas, 2016.
- NICOLAZZO, J. A.; REED, B. L.; FINNIN, B. C. The effect of various in vitro conditions on the permeability characteristics of the buccal mucosa. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 92, n. 12, p. 2399-2410, 2003.
- NUNES, L. C. C. et al. Desenvolvimento de gel vaginal contendo extrato de própolis vermelha. *Rev Bras Farm [Internet]*, v. 93, n. 2, p. 179-85, 2012.
- O'HANLON, D.E.; MOENCH, T. R.; CONE, R. A. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PloS one*, v. 8, n. 11, p. e80074, 2013.
- OLIVEIRA, A.G.L.; SILVA, R.S; ALVES, E.N.; PRESGRACE, R.F.; PRESGRACE, O.A.F; DELGADO, I.F. Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative 105 tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. *Rev Inst Adolfo Lutz*, v.71, n.1, p. 153-9, 2012.
- OLIVEIRA, Mariana Pohlmann de et al. Composição pheetocare, processo para produzir uma composição pheetocare e uso da mesma. Depositante: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. BR n. 102017016881-6 A2.
- OMS. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2007.
- Organización Mundial de la Salud. Pautas para la evaluacion de medicamentos herbários. Ginebra: Organización Mundial de La Salud; Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/61330/1/WHO_TRM_91.4_spa.pdf

OSHIRO, M. C.; MIGUEL, M. D.; DIAS, J. F. G.; GOMES, E.G.; MIGUEL, O. G. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, v. 4, n. 4, p. 116-122, 2016.

OWEN, D. H.; KATZ, D.F. A vaginal fluid simulant. *Contraception*, v. 59, n. 2, p. 91-95, 1999.

PATTON, D. L.; THWIN, S. S.; MEIER, A.; HOOTON, T. M.; STAPLETON, A. N.; ESCHENBACH, D. A. Epithelial cell layer thickness and immune cell populations in the normal human vagina at different stages of the menstrual cycle. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 183, n. 4, p. 967-973, 2000.

PEREIRA, M. N. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de quitosana para liberação prolongada de cetoconazol na mucosa vaginal. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

PEREIRA, M. N.; REIS, T. A.; MATTOS, B. N.; CUNHA-FILHO, M.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Novel ex vivo protocol using porcine vagina to assess drug permeation from mucoadhesive and colloidal pharmaceutical systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 158, p. 222-228, 2017.

PERFEITO, J. P. S. O registro sanitário de medicamentos fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2012.

POLEWSKI, K.; KNIAT, S.; SLAWINSKA, D. Gallic acid, a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment : spectroscopic studies. *Current Topics in Biophysics*, v. 26, n. 2, p. 217–227, 2002.

PRAÇA, F. S. G.. Liberação e permeação in vitro de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

REFAI, H.; HASSAN, D.; ABDELMONEM, R. Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate. *Drug delivery*, v. 24, n. 1, p. 278-288, 2017.

RIBAS, M. O.; SOUZA, M. H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. *Revista Odonto Ciência*, v. 21, n. 53, p. 245-252, 2006.

RODRIGUES, E. R.; GALVÃO, F. Florística e fitossociologia de uma área de reserva legal recuperada por meio de sistema agroflorestal na região do Pontal do Paranapanema, São Paulo. *Floresta*, v. 36, n. 2, 2006.

ROSA, C. G. et al. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, v. 46, p. 138–146, abr. 2013.

- RUAS, E. A. et al. Anatomy and genetic diversity of two populations of *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) from the Tibagi River basin in Parana, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 10, n. 1, p. 526-536, 2011.
- SANTOS, E.; MARANGON, L. C.; RAMALHO, R. S. Levantamento dendrológico da Bacia do Rio São Bartolomeu, Viçosa, MG. *Revista Ceres*, v.45, n. 260, p. 339- 349, 1998.
- SANZ, R.; CLARES, B.; MALLANDRICH, M.; SUÑER-CABÓ, J.; MONTES, M. J.; CALPENA, A. C. Development of a mucoadhesive delivery system for control release of doxepin with application in vaginal pain relief associated with gynecological surgery. *International journal of pharmaceutics*, v. 535, n. 1-2, p. 393-401, 2018.
- SASSI, A. B.; MCCULLOUGH, K. D.; COST, M. R.; HILLIER, S. L.; ROHAN, L. C. Permeability of tritiated water through human cervical and vaginal tissue. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 93, n. 8, p. 2009-2016, 2004.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.
- SILVA, L. B. L. Preparação e avaliação biofarmacêuticas de formas semi-sólidas da aroeira da praia *Schinus terebinthifolius* Raddi. 1999. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.
- SILVA, L. B. L.; ALBUQUERQUE, E.; SANTANA, D. Avaliação clínica preliminar de diferentes formulações de uso vaginal à base de aroeira (*Schinus terebinthifolius* raddi). *Rev Bras Med*, v. 61, n. 6, p. 381-384, 2004.
- SILVA, N. C. S.; VITOR, A. M.; BESSA, H. H. S.; BARROS, R. M. S. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. *Única Cadernos Acadêmicos*, v. 3, n. 1, 2017.
- SOARES, L. A. L. Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reissek. – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). 2002. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, 2002.
- SQUIER, C. A.; HALL, B. K. In-vitro permeability of porcine oral mucosa after epithelial separation, stripping and hydration. *Archives of oral biology*, v. 30, n. 6, p. 485-491, 1985.
- SQUIER, C. A.; MANTZ, M. J.; SCHLIEVERT, P. M.; DAVIS, C. C. et al. Porcine vagina ex vivo as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 97, n. 1, p. 9-21, 2008.
- STRAPASSON, M.; DOS SANTOS, A. F.; MEDEIROS, AC de S. Fungos associados às sementes de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*). *Pesquisa Florestal Brasileira*, n.45, p. 131-135, 2002.
- TAPPIN, M. R. R.; LUCCHETTI, L. Sobre a legislação de registro de fitoterápicos. *Revista Fitos*, v. 3, n. 01, p. 17-30, 2013.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA / THE NATIONAL FORMULARY. USP 37–NF 32; GENERAL CHAPTER <1724> Semisolid Drug Products - Performance Tests, p. 1273–1284, 2014.

THOMPSON I.O. C.; VAN DER BIJL P.; VAN WYK, C.W.; VAN EYK, A. D. Comparative light-microscopic, electron microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium. *Arch Oral Biol* v. 56, p. 1091–1098, 2001.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Center of Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry, Nonsterile semisolid dosage forms, scaleup and post-approval changes: chemistry, manufacturing, and control; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. 1997.

VALOTTO, C. F. B.; SILVA, H. H. G.; CAVASIN, G.; GERIS, R.; FILHO, E. R.; SILVA, I. G. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v. 44, n. 2, 2011.

VAN EYK, A. D.; VAN DER BIJL, P. Porcine vaginal mucosa as an in vitro permeability model for human vaginal mucosa. *International journal of pharmaceutics*, v. 305, n. 1-2, p. 105-111, 2005.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 35, n. 3, p. 473–85, 2013.

VICKERY, M. L. E.; VICKERY, B.; Secondary Plant Metabolism, The Macmillan Press LTD: London, 1981.

WATKINS, N. G.; HADLOW, W. J.; MOOS, A. B.; CALDWELL, H. D. Ocular delayed hypersensitivity: a pathogenetic mechanism of chlamydial-conjunctivitis in guinea pigs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 83, n. 19, p. 7480-7484, 1986.

WILSON, S.L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicol*, v. 327, p. 32–46, 2015.

**APÊNDICE A – COMPILAÇÃO DA DESCRIÇÃO E ALTERAÇÕES DAS
EXIGÊNCIAS NAS LEGISLAÇÕES DE REGISTRO DE FITOTERÁPICOS DESDE
A PIONEIRA ATÉ A ATUAL, DE MANEIRA RESUMIDA.**

Legislação	Descrição/inclusão/alteração
Portaria nº 22 de 30 de outubro de 1967	Pioneira. Exige informações sobre a caracterização botânica, e da droga vegetal, características organolépticas, físico-químicas, fitoquímicas, fundamentação para o emprego terapêutico (referência ou trabalho científico), ausência de efeitos tóxicos e experimentação farmacológica em animal.
Portaria nº 6 de 31 de Janeiro de 1995	Exige controle de qualidade da planta fresca, droga vegetal, produto fitoterápico intermediário e produto fitoterápico (dados de produção, processo de fabricação, estudos de estabilidade com prazo de validade). Exige estudos que comprovem a segurança do uso. Deve ser feita validação de metodologias de CQ (não especifica como).
RDC nº 17 de 24 de 2000	Define os conceitos de medicamento fitoterápico novo, tradicional e similar. Exige apresentação dos controles de processo de estabilização da droga vegetal. Viabiliza três formas distintas de registrar medicamentos tradicionais.
RDC nº 48 de 2004	Conceitos de medicamentos fitoterápicos novos, tradicionais e similares foram retirados. Inclusão de 3 formas de comprovação de requisitos terapêuticos. Exige apresentação de bula, indicação de prazo de validade conforme estudos de estabilidade acelerada, descrição e validação das metodologias. Droga vegetal: requisição de metodologias validadas seguindo guia ANVISA. Derivados de drogas vegetais: informação sobre solvente e/ou veículos, análise de fornecedor, validação dos métodos de análise pelo guia da ANVISA. Especificação de material de embalagem. Comprovação de uso seguro passou de 10 para 20 anos.

RDC nº 16 de 2010	Produção de lotes piloto. Inclui a possibilidade de registro de fungos multicelulares e algas. Traz um título específico sobre as Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC) de medicamentos fitoterápicos. Passa a valer a RDC 17/2010 para as BPFC.
RDC nº 26 de 2014	Classificação em Medicamento fitoterápico (segurança e eficácia baseadas em pesquisas clínicas) e Produto tradicional fitoterápico (passíveis de registro ou notificação; segurança e efetividade baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização).